SELEKTIVE ERFASSUNG VON REPLIKATIONSURSPRÜNGEN IN DER DNA VON EHRLICH-ASZITES-TUMORZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HILDEGARD KIENZLE-PFEILSTICKER
aus Herrenberg

1985

SELEKTIVE ERFASSUNG VON REPLIKATIONSURSPRÜNGEN IN DER DNA VON EHRLICH-ASZITES-TUMORZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
HILDEGARD KIENZLE-PFEILSTICKER
aus Herrenberg

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	3. 10. 1985
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Probst
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Eisele

FÜR MEINE ELTERN UND MOGGA

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. H. Probst

am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Probst für die Überlassung von Thema und Arbeitsplatz, für seine wertvolle Hilfe bei organisatorischen und technischen Problemen, sowie für seine Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Ich danke außerdem Dr. S. Bäzner für die Einweisung in die Elektronenmikroskopie und Dr. F. Dittmann für die Hilfe bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder.

Herrn Dr. R. Goess danke ich für seine Hilfe beim Plotten von Diagrammen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material	8
2.1.	Zellen	8
2.2.	Kulturmedium	8
2.3.	Kulturgefäße	8
2.4.	Puffer und sonstige Lösungen	9
2.5.	Enzyme	9
2.6.	Radiochemikalien	10
2.7.	sonstige Chemikalien	10
2.8.	Material für die Radioaktivitätsbestimmung	10
2.9.	λ plac 5 - DNA	11
2.10.	Material für die Elektronenmikroskopie	11
2.11.	Fotomaterial	12
3.	Methoden	13
3.1.	Zellkultur	13
3.1.1.	Entnahme der Zellen aus der Maus	13
3.1.2.	Bestimmung der Zelldichte	13
3.1.3.	In vitro-Kultur	13
3.1.4.	In vitro-Kultur unter Hypoxie	14
3.1.5.	Aufheben der Hypoxie	14
3.1.6.	Probennahme aus einer hypoxischen Kultur	14
3.1.7.	Probennahme und Markierung unter Anaerobie	16
3.1.8.	Konditionierung des Kulturmediums	16
3.1.9.	Waschen von Zellen	17
3.2.	Synchronisation von Zellen	17
3.2.1.	Zonalzentrifugation	17
3.2.2.	Anaerobieblock	18
3.2.3.	Methotrexat- und/oder Aphidicolinblock und deren Aufhebung	18

		Seite
3.3.	Markierung von DNA mit radioaktiven Nukleosiden	19
3.3.1.	In vivo-Langzeitmarkierung mit ^{14}C-Thymidin	19
3.3.2.	In vitro-Langzeitmarkierung mit ^{14}C-Thymidin	19
3.3.3.	Einbau von radioaktiv markierten Nukleosiden in säurefällbares Material ganzer Zellen	19
3.3.4.	Bestimmung der Aufnahme von radioaktiv markierten Nukleosiden in das säurelösliche Material ganzer Zellen (Pool)	20
3.3.5.	Pulsmarkierungen	20
3.3.6.	Dauermarkierungen	21
3.3.7.	Radioaktive Markierung mit anschliessendem Chase	21
3.4.	DNA-Isolierung	21
3.4.1.	DNA-Isolierungsmethode A	21
3.4.2.	Schonende Isolierung von DNA zur Erhaltung und Anreicherung replikativer Strukturen	22
3.4.2.1.	Kernpräparation	23
3.4.2.2.	Eco RI-Verdau	23
3.4.2.3.	Lyse und Proteinase K-Verdau	24
3.4.2.4.	Isopyknische Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation	24
3.4.2.5.	Behandlung mit Harnstoff und Kochsalz	24
3.4.2.6.	Nitrozellulose-Chromatographie	25
3.5.	Vorbereitung der DNA für die Elektronenmikroskopie	26
3.6.	Vernetzung von DNA in ganzen Zellen mit Trioxsalen	26
3.7.	DNA-Bestimmung mit Bisbenzimid	27
3.8.	Sucrosegradientenzentrifugation	28
3.8.1.	Alkalischer Sucrosegradient	28
3.8.2.	Probenlyse auf dem alkalischen Sucrosegradienten	29

		Seite
3.9.	DNA-Faserautoradiographie	30
3.9.1.	Vorbereitung der Objektträger	30
3.9.2.	Markierung und Vorbereitung der Zellen	30
3.9.3.	Ausstreichen der Zellen	30
3.9.4.	Dippen, Exposition und Entwicklung der Objektträger	31
3.9.5.	Fotographische Arbeiten	32
3.9.6.	Auswertung	32
3.10.	Elektronenmikroskopische Methoden	33
3.10.1.	Diffusionsmethode	33
3.10.2.	Denaturierende Spreitung	34
3.10.3.	Färben und Schrägbedampfung	34
3.10.4.	Bildauswertung	36
3.11.	Aufnahme einer Reassoziationskinetik	37
3.11.1.	Vorbereitung der DNA	37
3.11.2.	Hydroxylapatit-Chromatographie	38
3.12.	Radioaktivitätsbestimmungen	39
3.12.1.	Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität ganzer Zellen	39
3.12.2.	Bestimmung der säurelöslichen Radioaktivität ganzer Zellen	40
3.12.3.	Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität von DNA in wässriger Lösung	40
3.12.4.	Bestimmung der absoluten Radioaktivität säuregefällter Zellproben	40
4.	Ergebnisse und Diskussion	41
4.1.	Synchronisation der Zellen zur Anreicherung initiierender Zustände	41
4.1.1.	Wirkung von Sauerstoffentzug	41
4.1.1.1.	Einleitung	41
4.1.1.2.	Verlauf der DNA-Synthese-Aktivität synchroner Zellen	43

Seite

4.1.1.3. Stimulierung der DNA-Synthese durch Wiederbelüften 46

4.1.1.4. Stimulation der Initiation der DNA-Synthese durch Desoxycytidin 51

4.1.2. Wirkung der Hemmstoffe Methotrexat und Aphidicolin 58

4.1.2.1. Aphidicolin 58

4.1.2.2. Einfluß verschiedener Aphidicolinkonzentrationen auf die DNA-Synthese 60

4.1.2.3. Einfluß von Aphidicolin auf das Wachstum asynchroner und synchroner Zellen 62

4.1.2.4. Methotrexat 71

4.1.2.5. Reversible Blockierung synchroner Zellen an der G1/S-Phasengrenze 73

4.1.2.6. Größenverteilung der neusynthetisierten DNA 77

4.1.2.7. DNA-Synthese-Aktivität synchroner Zellen unter Einwirkung von Hemmstoffen 82

4.1.2.8. Größenverteilung und Reifung der neusynthetisierten DNA synchroner Zellen unter Einwirkung von Hemmstoffen 83

4.1.2.9. Zusammenfassung und Diskussion 92

4.1.3. Faserautoradiographie 94

4.1.3.1. Einleitung 94

4.1.3.2. Einfluß verschiedener Temperaturen auf die DNA-Replikation 95

4.1.3.3. Einfluß von Sauerstoffentzug und Aphidicolin auf die DNA-Replikation 97

4.2. Diskussion der Synchronisationsmethoden 101

4.3. Elektronenmikroskopische Analyse neusynthetisierter DNA 105

4.3.1. Einleitung 105

4.3.2. Trioxsalen 109

4.3.3. Quervernetzung der DNA in vivo 110

4.3.4. Analyse der replikativen Strukturen aus am Anfang der S-Phase angereicherten Zellen 117

Seite

4.4. Reassoziationsverhalten neusynthetisierter DNA aus am Anfang der S-Phase angereicherten Zellen 125

4.5. Diskussion 131

5. Zusammenfassung 141

6. Literaturverzeichnis 144

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Ap_4A	Diadenosin-5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphat
Bp	Basenpaare
BrdUrd	5-Brom-Desoxyuridin
Ci	Curie
cpm	Impulse pro Minute
D	Dalton
dCMP, dCDP, dCTP	Desoxycytidin-5'-mono-, di-, triphosphat
dCyt	Desoxycytidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase	Desoxyribonuklease
dpm	Zerfälle pro Minute
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUMP	Desoxyuridin-5'-monophosphat
et al.	und andere
EDTA	Äthylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
EGTA	Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
HA	Hydroxylapatit
kB	1000 Basen
MTX	Methotrexat
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	2,2'-Phenylen-bis-(5-phenyloxazol)
rDNA	DNA, die für ribosomale Gene kodiert
RNAase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Sedimentationskoeffizient
s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SV 40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge

1. Einleitung

Die semikonservative DNA-Replikation der Eukaryonten ist ein Vorgang, der in seiner Komplexität noch nicht überschaubar ist. Im Vergleich zum Genom des Bakteriums E. coli mit $3{,}8 \times 10^6$ Basenpaaren ist das Genom menschlicher Zellen etwa 1000 mal größer und wesentlich komplexer, sowohl hinsichtlich der DNA-Sequenz, als auch der strukturellen Organisation der DNA. Die DNA in Eukaryonten liegt, komplexiert mit Histonen und Nicht-Histonproteinen, hochgeordnet und in mehreren Organisationsstufen vor. Sie kann sich dadurch im Metaphase-Chromatid auf 1/10 000 ihrer Länge verkürzen (8).

Die am besten bekannte räumliche Ordnung ist die durch Histonoktamere in Nukleosomen organisierte DNA-Helix. Weitere Strukturen sind die einer Chromatinfibrille, Schleifen oder Domänen, die an einer ordnenden Struktur haften, und die Anordnung in den kondensierten Chromosomen. Die Größe und strukturelle Organisation der Genome, besonders in höheren Eukaryonten, bedingen einen anderen mechanistischen Ablauf der DNA-Replikation als bei Prokaryonten. In dem ringförmigen DNA-Molekül von E. coli starten, ausgehend vom Replikationsursprung, zwei Gabeln bidirektional und treffen sich nahe dem gegenüberliegenden Ende wieder, wenn fast die gesamte DNA repliziert ist (9). Auf ähnliche Weise repliziert auch der eukaryontische Virus SV 40 (9, 137). In eukaryontischen Zellen würde die S-Phase bei einer mittleren Gabelgeschwindigkeit von 50 Nukleotiden/s 800 Stunden dauern. Daß dennoch das gesamte Genom somatischer Zellen in 8 - 10 Stunden verdoppelt wird, wird durch die Aktivierung mehrerer Replikationsursprünge, etwa 100 pro Chromosom, erreicht. Die Anzahl der aktivierten Replikationsursprünge hängt vom Zustand der Zellen ab. In Drosophila-Embryonen dauert die S-Phase, ohne merkliche Erhöhung der Gabelgeschwindigkeit, nur 3 - 4 Minuten (10). Der durch Faserautoradiographie bestimmte Abstand zwischen zwei aktivierten Replikationsursprüngen auf dem Genom (In-

terinitationsabstand) verkürzte sich von 13 auf 2,7 µm. Die Gabelgeschwindigkeit ist jedoch keine unveränderliche Größe und schwankt in den bisher untersuchten Organismen zwischen den Extremwerten von 0,1 - 2 µm/Minute und Gabel (11). Die Technik der Faserautoradiographie, 1963 von Cairns entwikkelt (12), erbrachte aber noch mehr Erkenntnisse über den Ablauf der eukaryontischen DNA-Replikation. Danach ist die DNA in viele Replikationseinheiten ("cluster") von 20 - 80 Replikons unterteilt, wobei jedes Replikon einen Replikationsursprung enthält. "Cluster" von Replikons werden räumlich und zeitlich geordnet aktiviert. Die Aktivierung der Replikationsursprünge während der Initiationsphase führt dazu, daß Replikationsgabeln vom Startpunkt bidirektional loslaufen und im Elektronenmikroskop zum Erscheinen von Augen ("bubbles") führen. Mit dem Fortschreiten der Gabeln während der Elongationsphase treffen sich Gabeln benachbarter Replikons und verschmelzen während der Terminationsphase. Nach Abschluß des als Reifung bezeichneten Vorgangs liegt chromosomale DNA vor. Diese Vorstellung wird außer durch Faserautoradiographie auch durch elektronenmikroskopische und biochemisch analytische Untersuchungen bestätigt (1, 3, 4, 5).

Ein ordnendes Prinzip für diese komplizierten Vorgänge bei der DNA-Replikation wurde von Dingman (13) vorgeschlagen. Viele Untersuchungen über Kernstrukturen und ihre Beziehung zu Replikation und Transkription befassen sich damit (14 - 16).

Unter derartigen Kernstrukturen ist die von Berezney und Coffey (17) zuerst isolierte Kernmatrix am bekanntesten. Ihre Beteiligung an der Replikation wird häufig diskutiert. Nach Ebinger (14) gibt es Hinweise, daß Matrixbindungsstelle und der Ort der DNA-Synthese nicht identisch sind.

Über die Vorgänge an der laufenden Replikationsgabel existieren noch die genauesten Vorstellungen, obwohl auch hier

noch vieles ungeklärt ist, wie zum Beispiel die Frage nach der Diskontinuität der DNA-Synthese, die Verteilung der Histonoktamere und die Zusammensetzung von Replikationskomplexen und deren Eigenschaften (18 - 21).

Die Termination ist ein von der Initiation und Elongation abgrenzbarer Vorgang. Aufeinandertreffende Replikationsgabeln verschmelzen erst nach zum Teil erheblichen Wartezeiten miteinander (22 - 24, 26). Die daran beteiligten Enzyme, Proteine und die Faktoren, die den zeitlichen Ablauf bestimmen, sind unbekannt.

Genauso unverstanden ist die als wichtigster Angriffspunkt regulatorischer Vorgänge betrachtete Initiation der DNA-Replikation.

Das trifft sowohl auf die molekularen Abläufe zu, die zur Initiation führen, als auch auf die an der Aktivierung von Replikationsursprüngen beteiligten Faktoren, Proteine, Enzyme und Strukturen (1, 3, 6, 18, 27).

Der Eintritt in die S-Phase unterliegt vielen regulatorischen Einflüssen (3, 27 - 44) und ist von großer Bedeutung für die Proliferation von Zellen. Aber auch während der S-Phase scheinen Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in eine Art Ruhezustand, S_o, übergehen zu können (45).

Bestimmte DNA-Sequenzen werden in aufeinanderfolgenden Zellzyklen etwa im gleichen Bereich der S-Phase repliziert, wie durch Replikationsbänder nach BrdUrd-Dichtemarkierung und Fluoreszenzmikroskopie erkennbar ist (46). Es scheint so zu sein, daß sogenannte "house-keeping"-Gene, die konstitutiv exprimiert werden, in der frühen S-Phase, und gewebespezifische Gene, je nach Zustand der Zelle, in der frühen oder späten S-Phase repliziert werden. Heterochromatin, Satelliten-DNA und das X-Chromosom werden in der späten S-Phase repliziert. Mit der Expression eines

Gens gehen Änderungen in der Chromatinstruktur einher, die den experimentell gefundenen, mittelstark DNAse I-empfindlichen Bereichen, die außerdem in der Größenordnung von Replikons liegen, entsprechen könnten (47). Mittelrepetitive Sequenzen, die über das Genom verstreut sind, sind in diesem Zusammenhang ebenso interessant: Viele ähneln mobilen genetischen Elementen (48, 49) und könnten Träger von Replikationsursprüngen sein. Diese könnten entweder durch ihre DNA-Sequenz oder ihre räumliche Struktur, gegebenenfalls über Konformationsänderungen, die Initiation der DNA-Replikation erlauben.

Replikationsursprünge, deren Sequenzen bekannt sind, hat man bisher vor allem in Bakterien (50, 51, 54), Bakteriophagen (7), Hefe (52), Mitochondrien (53) und eukaryontischen Viren (2, 55) gefunden. Modellbeispiel ist das Affenvirus SV 40, der am Replikationsursprung ein 27 Basenpaare langes Palindrom besitzt. Auch etwa 1 % der eukaryontischen DNA besteht aus solchen Palindromsequenzen. SV 40 kann in Xenopus laevis-Eiern auch ohne die Initiationssequenz replizieren. Es wird dann an einer beliebigen Stelle im Genom initiiert (57). Die Bestrebungen, Initiationssequenzen im eukaryontischen Genom zu finden, führten zum Teil zu widersprüchlichen Aussagen (57 - 61). Man muß allerdings beachten, daß Virusmodelle nur bedingt auf die eukaryontische Replikation anwendbar sind, da sie einen Adaptionsmechanismus von Viren zur Umgehung der zellulären Replikationskontrolle darstellen können. Bessere Kandidaten für Initiationsstellen sind die ars-Sequenzen der Hefe und anderer Organismen (62 - 65). In ein Plasmid integriert erhöhen sie die Transformationshäufigkeit von Hefen, da sie autonom replizieren können. Sie können in E. coli nicht die Funktion eines Replikationsursprungs übernehmen. Ihre Häufigkeit im Hefe-Genom stimmt mit der Anzahl der Initiationsstellen etwa überein.

Weitere gut handhabbare Systeme sind amplifizierte rDNA-Gene. In Lytechinus variegatus sind sie etwa 200 mal amplifiziert. Der Replikationsursprung liegt, ebenso wie bei Tetrahymena und Physarum (67 - 69), im nicht transkribierten Teil ("spacer") der Gene (66).

Mittelrepetitive Sequenzen, die etwa 10^4 - 10^5 mal im Genom vorkommen, und deren Funktion noch nicht bekannt ist, sind die etwa 300 Basenpaare langen Alu-, Kpn I-, und Hinf-Sequenzen der Primaten und des menschlichen Genoms (70, 71, 192), und die B1- und B2-Sequenzen des Mäusegenoms (72, 73). Die Alusequenz hat eine 14 Basenpaare lange Konsensus-Sequenz mit dem Replikationsursprung des Papovavirus.

In einem Teil der Bam-Sequenz findet man ebenfalls Homologien zu ihm.

In Untersuchungen im Zusammenhang mit der Kernmatrix findet man neusynthetisierte DNA an sie gebunden (14, 75 - 77). In synchronen 3T3-Zellen sind nach ausgiebigem DNAse-Verdau DNA-Fragmente bevorzugt an die Matrix assoziiert, die Homologien zur Erkennungsstelle der ersten T-Antigenbindung besitzen und Teile mittelrepetitiver DNA sind (74).

Das größte Hindernis bei der Untersuchung der Initiation der DNA-Replikation in Eukaryonten besteht darin, daß initiierende Zustände im Experiment nur schwer von den beiden anderen Teilvorgängen, der Elongation und Termination, abgrenzbar sind. Eine Zellkultur, die am Anfang der S-Phase synchronisiert worden ist, durchläuft die S-Phase auf Replikonebene asynchron, das heißt, das zellinterne Replikationsprogramm der einzelnen Zellen variiert in seinem Zeitbedarf. Die Zellen enthalten Replikationsintermediate aus allen Stadien der Initiation, Elongation und Termination. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, das Initiationsstadium so anzureichern, daß es unabhängig von den anderen beiden Teilvorgängen untersucht werden kann. Da die ersten

Replikationsinitiationen der S-Phase am besten definiert sind und auch am besten nachweisbar sind, wurde versucht, diese anzureichern, um sie einer Analyse zugänglich zu machen.

Als Ausgangsmaterial boten sich die in unserem Labor verwendeten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen nach Selektion von G1-Zellen durch Zonalzentrifugation an (78). Die G1-Zellen mußten weiter synchronisiert werden, da sie in den einzelnen G1-Phasen-Dauern variieren, und somit zu unterschiedlichen Zeiten in die S-Phase eintreten. Zum einen wurde mit der von Gekeler (80) ausgearbeiteten Methode mittels zwölfstündiger Anaerobiose gearbeitet, zum anderen mit Hemmstoffen der DNA-Synthese. Synchronisation mittels Anaerobiose hat den Vorteil, unphysiologische Effekte weitgehend zu vermeiden, da angenommen werden kann, daß die Zellen im Peritoneum der Maus teilweise auch unter starkem Sauerstoffmangel leiden.

Die unerwünschten Nebeneffekte von Hemmstoffen müssen bei ihrem Einsatz immer berücksichtigt werden. Über die Wirkung von Methotrexat, einem Hemmstoff der Dihydrofolatreduktese, lagen ein paar Untersuchungen vor. Ehrlich-Aszites-Tumorzellen lassen sich durch das Schema: Selektion von G1-Zellen und anschließender zwölfstündiger Methotrexatblock, gut am Anfang der S-Phase arretieren. Sie durchlaufen nach Blockaufhebung die S-Phase in guter Synchronität (79).

Während des Blocks werden jedoch kurze DNA-Stücke mit radioaktiv markierten Nukleosiden markiert, die unter dem Block nicht wachsen (81). Nach Blockaufhebung findet teilweise Reparatursynthese statt (82). Unter Block akkumulierte DNA reift nach Blockaufhebung vollständig (83).

Aphidicolin, ein spezifischer Hemmstoff der α-Polymerase, wurde, obwohl er noch nicht so lange bekannt ist, schon in sehr vielen Systemen auf seine Wirkung auf Replikation und

Reparatur untersucht (84 - 89). Trotz widersprüchlicher Befunde scheint er für Zellen wenig toxisch zu sein und spezifisch auf die DNA-Synthese zu wirken. Zur Synchronisation der Zellen wurden daher beide Hemmstoffe alleine, und in Kombination getestet. Die Initiation der DNA-Synthese wurde durch radioaktive Markierung neusynthetisierter DNA und Analyse im alkalischen Sucrosegradienten verfolgt. Weitere Parameter, wie relative Initiationshäufigkeit, Gabelgeschwindigkeit und Interinitiationsabstand konnten mittels Faserautoradiographie gewonnen werden. Aus den synchronisierten Zellen wurde DNA schonend isoliert, replikative Strukturen angereichert und einer elektronenmikroskopischen Analyse unterworfen. Die Reassoziationseigenschaften der neusynthetisierten DNA wurden bestimmt.

2. Material

2.1. Zellen

Die Ehrlich-Aszites-Tumorzellen stammten ursprünglich von Dr. Karzel (118) und können sowohl in vivo als auch in vitro in Suspensionskultur permanent gehalten werden (118, 119). Ihre biologischen Eigenschaften sind von Probst (79) beschrieben. Zur in vivo-Haltung wird gesunden weiblichen NMRI-HAN-Mäusen (Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover) von 20 - 25 g Gewicht 0,2 ml eines 7 Tage alten Aszites (etwa $2{,}5 \times 10^6$ Zellen) in die Bauchhöhle injiziert. Für die in vitro-Kultur und Experimente wurde 4 Tage alter Aszites aus der Maus entnommen, wobei der Tag des Überimpfens als nullter Tag zählt. Die Zellen befinden sich dann noch in der logarithmischen Wachstumsphase (79).

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden Zellen verwendet, die nach Gekeler (80) nach etwa 50 in vitro- und 5 in vivo-Passagen in flüssigem Stickstoff eingefroren waren. Für die Versuche wurden sie nach Auftauen und etwa 5 in vivo-Passagen verwendet.

2.2. Kulturmedium

Die Herstellung und Aufbewahrung des Kulturmediums erfolgte nach Schindler (119) und (90).

2.3. Kulturgefäße

Zur Vermeidung von Randwuchs wurden alle Kulturgefäße mit Nitriersäure (2 Volumenteile H_2SO_4 konz. > 98 %; 1,5 Volumenteile HNO_3 rauchend 95 - 98 %; 0,5 - 1 Volumenteil Oleum 65 %) mindestens 16 Stunden gereinigt.

2.4. Puffer und sonstige Lösungen

Hanks-Lösung siehe Gekeler (80)

SSC: 0,15 M NaCl; 0,015 M Na_3-Citrat

Puffer C: 50 mM Tris; 5 mM EDTA; 10 mM NaCl; pH 8

Puffer A 58: 0,24 M Sucrose; 0,01 M Tris/HCl; 5 mM $MgCl_2$; 0,5 % Brij 58; pH 7,5

Verdaupuffer E: 15 mM Tris/HCl; 65 mM NaCl; 60 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA; 0,15 mM Spermin; 5 mM ß-Mercaptoäthanol; 0,02 % Triton X-100; 0,5 mM Spermidin pH 7,4; in bidestilliertem Wasser

Stop-Puffer: 5 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; in 1 l Verdaupuffer E

Lyse-Lösung: 50 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 100 mM EDTA; 1 % Sarkosyl; pH 7,9

0,1 bzw. 0,4 TBS-Puffer: 0,1 bzw. 0,4 M NaCl; 50 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 6,75

PBS def: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,15 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O; 0,2 g KH_2PO_4; auf 1 l H_2O

Lyse-PBS def: PBS def mit 1 % SDS; 10 mM EDTA

0,12 M und 0,4 M PB: 120 mM bzw. 400 mM Phosphatpuffer pH 7; hergestellt aus NaH_2PO_4- und Na_2HPO_4-Lösung in der entsprechenden Molarität und Titration der basischen Komponente durch die saure Komponente

TE: 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8

Phenol pH 9: Frisch über Stickstoff destilliertes Phenol wird mit 1 mM EDTA-Lösung im Verhältnis 9 : 1 gemischt, mit 12 N KOH auf pH 9 eingestellt und baldmöglichst verwendet.

Labarca-Puffer: 2 M NaCl; 50 mM Na-PO_4; 2 mM EDTA; pH 7,4

2.5. Enzyme

RNAase-"mixture": Pandreat. RNAase, Serva, Heidelberg, 45 Kunitz-E/mg lyophylisiert, in 1 mg/ml

H_2O dest. gelöst, wurde 3 x 10 Minuten auf 80° C erhitzt, zwischendurch auf Trokkeneis eingefroren und anschließend mit 10 000 Einheiten RNAase T 1 (Serva) versetzt.

Proteinase K: (Merck) 5 mg/ml H_2O dest. lösen und eingefroren aufbewahren.

Endodesoxyribonuklease: Eco RI: aus eigener Isolierung nach (76).

2.6. Radiochemikalien

(Methyl-^{3}H)-Thymidin, 70 - 80 Ci/mMol, New England Nuclear
(5 -^{3}H)-Desoxycytidin, etwa 30 Ci/mMol, New England Nuclear (wurde vor Gebrauch eingetrocknet)
(2-^{14}C)-Thymidin, etwa 50 mCi/mMol, Amersham Buchler

2.7. Sonstige Chemikalien

Methotrexat: Di-Natriumsalz, Merck.
Aphidicolin: Geschenk von Dr. A. H. Todd, Development Department, ICI, Macclesfield Cheshire, England
Trioxsalen: Sigma
Bisbenzimidazol: Hoechst 33258
Sucrose: Einmachraffinade von Südzucker

Bei allen übrigen Chemikalien handelte es sich um Produkte der Firmen Merck, Böhringer, Serva und Sigma.

2.8. Material für die Radioaktivitätsbestimmung

Carrier-DNA: 200 mg Kalbsthymus-DNA (Böhringer) in 1 l 0,1 SSC gelöst.

Toluol-Szintillator: 5 g PPO und 0,3 g POPOP in 1 l getrocknetem, frisch destilliertem Toluol (BASF) gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.

Tritonszintillator: 3 Volumenteile Triton X-100 (Serva) und 7 Volumenteile Toluolszintillator.

Hyamine-Hydroxide^{R}; Koch-Light-Laboratories Ltd.

Nitrozellulose-Membranfilter, Schleicher und Schüll, Typ BA 90, Porengröße 0,6 mm

Glasfaserfilter, Whatman GF/C

2.9. λ plac 5-DNA

Isoliert nach Bäzner (101) als S-Wert-Marker.
S-Werte aus Gekeler (80):
im neutralen Sucrosegradienten: 34,25
im alkalischen Sucrosegradienten: 39,4

2.10. Materialien für die Elektronenmikroskopie

Trägernetzchen aus Kupfer 200 mesh, 3,05 mm Durchmesser
Pd: Pt-Draht 80 : 20 (Plano)
und anderes Material wurde bezogen von Plano (Agar Aids) und TAAB Laboratories Ltd., wenn nicht anders angegeben.

3.5 % Parlodion-Lösung: trockene Parlodion-Streifen (Mallinkrodt) in N-Pentylacetat (EGA-Chemie) durch 4 - 6 wöchiges Stehen in einer braunen, dichtschließenden Flasche über Amberlite MB 1, Biorad, lösen.

Cytochrom c-Lösung: Cytochrom c (Typ 6 Herz, Sigma) 40 µg/ml in 0,6 M NH_4CH_3COO, pH 7

Formamid: (Merck) Destilliert nach Bäzner (100).

Uranylacetat-Lösung: Uranylacetat (Merck) 50 mM
Salzsäure 50 mM
in 90 %igem Äthanol unter Rühren
während zwei Tagen im Dunkeln lösen.

Glyoxal: Trimeres Dihydrat (Sigma)
40 %ige Lösung, nur direkt nach der Herstellung
verwenden: 73 mg und 100 µl H_2O 10 Minuten kochen.

2.11. Fotomaterial

Negativfilme: Agfa Ortho 25 24 x 36 mm für die Faserauto-
radiographie
60 - 70 mm für die Elektronen-
mikroskopie

Entwickler: Negative: Kodak D 19 für die Faserautoradio-
graphie (10 g/l Substanz A in 3/4
Volumenteile Wasser lösen, dazu dann
142 g/l Substanz B geben und auffül-
len auf 1 l)
Ilford Perceptol für die Elektronen-
mikroskopie

Positive: Neutol Liquid NE, Konzentrat, Agfa
1 : 10 verdünnt.

Fixiersalz: Acidofix

Positivpapier: Agfa Copyline P 90 DIN A 4
Labaphot Code P 100 DIN A 4, Labapos
Ilford Ilfospeed 5.1 M

Für die Autoradiographie: Nuclear Research Emulsion K 5,
Ilford

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Entnahme der Zellen aus der Maus

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und das Fell über dem Bauch aufgerissen. Sollten die Zellen sofort in Kultur genommen werden, wurden 2 ml Kulturmedium, das auf 37° C temperiert und mit 5 USP-Einheiten Heparin/ml (Liquemin^{R}; Roche) versetzt worden war, mit einer sterilen 5 ml-Einmalspritze (Innendurchmesser der Kanüle 0,8 mm) intraperitoneal injiziert und mit derselben Spritze wieder abgezogen. Sollten die Zellen durch Zonalzentrifugation selektioniert werden, wurden 3 ml eiskalte Hanks-Lösung, die ebenfalls Heparin enthält, injiziert. In 3 - 4 ml der entnommenen Zellsuspension sind etwa 5 x 10^{8} Zellen enthalten.

3.1.2. Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung ermittelt. Durch Zählen der Zellen in 16 mittleren Quadraten, was einem großen Quadrat entspricht, und Multiplikation mit 10^{4}, erhält man die Zellzahl pro ml.

3.1.3. In vitro-Kultur

Zellen, die direkt nach der Entnahme aus der Maus ohne vorherige Selektion bzw. Synchronisation für Experimente verwendet werden sollten, wurden vorher immer etwa 2 Stunden in Suspensionskultur genommen. Dazu wurden die Zellen in 37° C warmes Kulturmedium in einer Zelldichte von 500 000/ml eingesät. Nach Zonalzentrifugation selektionierte Zellen wurden in derselben Zelldichte eingesät.

Die Kulturflaschen wurden in einem auf 37° C gehaltenen Brutschrank unter Lichtschutz gelagert. Die Höhe der Kulturflüssigkeit im Kulturgefäß betrug maximal etwa 0,5 cm.

3.1.4. In vitro-Kultur unter Hypoxie

Zum Sauerstoffentzug von Zellkulturen wurde ein angefeuchteter und von Sauerstoffresten befreiter Gasstrom aus 95 % Argon und 5 % CO_2 in die Kultur eingeleitet. Der Aufbau ist bei Gekeler in (80) genau beschrieben. Der Gasstrom wurde so reguliert, daß die Kultur nicht sehr schäumte. Nach 20 Minuten läßt man das Gas über der Oberfläche der Kultur ausströmen. Die Begasungszeit betrug bis zu 12 Stunden.

3.1.5. Aufheben der Hypoxie

Die Hypoxie wurde durch Zusatz von 1/5 Volumenteil des Endvolumens an sauerstoffgesättigtem Medium aufgehoben (80). Dazu wurde, zum Teil konditioniertes, Medium 5 - 10 Minuten (bis 10 ml) bzw. 20 Minuten lang (bis 100 ml) über eine sterile Pipette mit reinem Sauerstoff begast. 4/5 Volumenteile (Endvolumen) der Kultur wurden zum sauerstoffgesättigten Medium zugegeben und umgeschwenkt. Nach Umschütten in ein frisches, vorgewärmtes Kulturgefäß konnte die Kultur noch einige Zeit weitergeführt werden.

3.1.6. Probenentnahme aus einer hypoxischen Zellkultur

Die Zellkultur wird nach 3.1.4. hypoxisch gemacht. Der dichtschließende Gummistopfen der Kulturflasche enthält neben dem Gaseinlaß und Gasauslaß zusätzlich eine lange, weite Kanüle. Mittels einer aufgesetzten Spritze wird die gewünschte Menge an Zellkultur aufgezogen. Sollen die Zellen weiterhin hy-

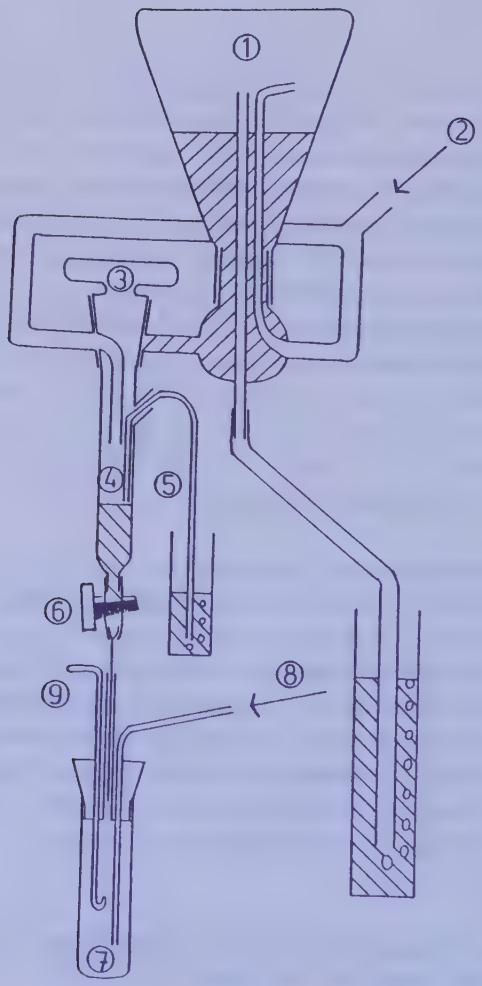


Abb. 1: Probenentnahme und Markierung unter anaeroben Bedingungen

poxisch gehalten werden, dann werden sie wie in 3.1.7. und Abb. 1 in ein begastes Inkubationsgefäß gegeben. Darin sind Substanzen entweder vorgelegt oder sie werden mittels ⑨ der Abb. 1 zugegeben.

3.1.7. Probennahme und Markierung unter Anaerobie (Abb. 1)

Zur Probennahme unter Anaerobie wurde der zur Zellkultur benützte Erlenmeyerkolben mit einem speziellen Aufsatz um 180° gekippt ①. Alle Teile des Aufbaus sind ständig von der Gasmischung durchströmt ②. Durch Drehen des Hahns ③ kann Kulturflüssigkeit in die kleine Säule fließen ④. Es werden 1 ml-Aliquots entnommen. Überflüssige Kulturflüssigkeit wird durch den im ganzen Inneren herrschenden Überdruck über den kleinen Schlauch herausgedrückt ⑤. Durch Öffnen der Klemme ⑥ wird die Kulturflüssigkeit in das Inkubationsgefäß ⑦ gedrückt, das ebenfalls begast wird ⑧. Im Inkubationsgefäß werden Substanzen entweder vorgelegt oder nach der gewünschten Zeit mittels ⑨ zugegeben. Der Einbaustop erfolgt durch Einbringen in 10 ml eiskalte Hanks-Lösung. Es wurde in einem auf 37° C thermostatisierten Raum gearbeitet.

3.1.8. Konditionierung des Kulturmediums

Konditioniertes Kulturmedium wird verwendet, um konstante Wachstumsbedingungen vor allem bei geringen Zelldichten (< 200 000 Zellen/ml) zu gewährleisten (80). Dazu wurden die frisch entnommenen Zellen einer Maus in vorgewärmtes Kulturmedium in einer Dichte von 1 - 1,5 x 10^6 Zellen/ml eingesät, 90 - 120 Minuten in Kultur gehalten und anschliessend steril abzentrifugiert (10 Minuten, 900 g). Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig bis einige Zentimeter über dem Sediment abgenommen und auf Zellfreiheit geprüft.

3.1.9. Waschen von Zellen

Die Zellen einer Kultur wurden in etwa 200 ml eiskalter Hanks-Lösung suspendiert und 5 Minuten bei 500 g abzentrifugiert, der Überstand zügig abgegossen und das Sediment nochmals mit Hanks-Lösung gewaschen.

3.2. Synchronisation von Zellen

3.2.1. Zonalzentrifugation

Durch Zentrifugation in einem Sucrosegradienten, von 2 - 31 % Sucrose (w/v) nach Probst und Maisenbacher (78, 79, 90) können die Ehrlich-Aszites-Tumorzellen von 4 - 6 Mäusen nach ihrer Größe und Dichte aufgetrennt werden. Die Zellen sedimentieren dabei gemäß dem Verlauf des Zellzyklus von der G1-, zur S- und G2+M-Phase schneller. (2 %ige Sucroselösung: in Hanks-Lösung, die nur 7,6 g NaCl/l enthält; 31 %ige Sucroselösung: in Hanks-Lösung ohne NaCl; alle Lösungen für die Zonalzentrifugation werden mit Penicillin (30 000 IE bzw. 18,4 mg/l und Streptomycin 45 mg/l; Grünenthal) versetzt.

Zentrifugiert wird in einem Zonalrotor Typ A der MSE Mistral 6L Zentrifuge bei 4° C. Der leicht konkave Gradient wird bei 300 - 400 rpm aufgebaut. Währenddessen werden die frisch aus der Maus entnommenen Zellen einmal mit eiskalter heparinisierter Hanks-Lösung gewaschen und in 20 ml 1 %iger Sucroselösung in Hanks-Lösung aufgenommen. Mittels einer 20 ml Einmalspritze werden die Zellen bei 300 rpm innerhalb einer Minute aufgetragen und mit 30 ml Hanks-Lösung überschichtet. Die Umdrehungszahl wird während der nächsten Minuten auf 900 rpm erhöht, und die Zellen während 8 Minuten Zentrifugationsdauer aufgetrennt. Danach wird die Umdrehungszahl wieder auf etwa 280 rpm gesenkt, und der Rotorinhalt durch Unterschichten mit 31 %iger Sucroselösung bei einer Pumpge-

schwindigkeit von 50 ml/Minute ausgepumpt. In einem Fraktionssammler werden 12,5 ml Fraktionen aufgefangen. Die gewünschten Fraktionen werden anhand des Trübungsprofils und ihrem Aussehen im Phasenkontrast ausgesucht und gepoolt. G1-Zellen findet man im aufsteigenden Teil des Trübungspeaks. Sie erscheinen im Phasenkontrast hell, rund und von gleicher Größe.

Die gepoolten Zellen werden einmal gewaschen, bevor sie in Kultur genommen werden.

3.2.2. Anaerobieblock

Nach Einsaat der selektionierten G1-Zellen wurde die Kultur anaerobisiert (3.1.4.) und für 12 Stunden anaerob gehalten, um eine weitere Synchronisation zu erreichen. Der Block wurde nach 3.1.5. aufgehoben.

3.2.2. Methotrexat- und/oder Aphidicolinblock und deren Aufhebung

Die Zellen wurden nach Einsaat in Kulturmedium zur weiteren Synchronisation für verschiedene Zeiten unter Methotrexat- und/oder Aphidicolinblock gesetzt. Dazu gibt man die entsprechende Menge an Methotrexat und Supplementen aus den sterilen, 100 fach konzentrierten Stammlösungen zu (Endkonzentrationen: Methotrexat 10^{-6} M, Supplemente: Adenosin 5×10^{-5} M, Glycin 10^{-4} M, Serin 10^{-4} M).

50 µl/ml Aphidicolin wird aus der Stammlösung in Äthanol (2 mg/ml und Verdünnungen) zugegeben. Die Äthanolkonzentration in der Kultur beträgt dann 0,5 %, wodurch die Zellen nicht beeinträchtigt werden.

Die Aufhebung des Methotrexatblocks erfolgte durch Zugabe von 5×10^{-5} M Thymidin (aus der 100 fach konzentrierten,

sterilen Stammlösung) oder, wenn sich eine längere Kultivierung der Zellen anschloß, durch Abzentrifugieren und Aufnehmen der Zellen in frischem, supplementiertem und Thymidin enthaltendem Medium.

Zur Aufhebung des Aphidicolinblocks wurden die Zellen ebenso abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen.

3.3. Markierung von DNA mit radioaktiven Nukleosiden

3.3.1. In vivo-Langzeitmarkierung mit ^{14}C-Thymidin

Um durchmarkierte, gereifte DNA zu erhalten, wurden einer Maus 14 - 20 Stunden vor der Entnahme des Aszites 5 µCi ^{14}C-Thymidin in steriler, isotoner Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert.

3.3.2. In vitro-Langzeitmarkierung mit ^{14}C-Thymidin

Eine 100 ml-Zellkultur wurde mit 5 µCi, das entspricht 0,05 µCi/ml, versetzt und 18 - 20 Stunden inkubiert.

3.3.3. Einbau von radioaktiv markierten Nukleosiden in säurefällbares Material ganzer Zellen

Die verschieden vorbehandelten Zellen wurden entweder mit 15 µCi/ml ^{3}H-Thymidin und unmarkiertem Thymidin auf 2×10^{-6} M (92) oder, unter Methotrexatblock, mit 20 µCi/ml ^{3}H Desoxycytidin versetzt und nach 10 Minuten 1 ml-Aliquots durch Einbringen in 10 ml eiskalte Hanks-Lösung in Einmalreagensgläsern gestoppt. Von nun an wird bei 0° C gearbeitet.

Die Zellen werden zweimal gewaschen, die sedimentierten Zellen gut resuspendiert und 30 Minuten mit 5 ml 5 % TCA gefällt.

Nach Abzentrifugation der Zellen (5 Minuten, 500 g) wird der Überstand dekantiert, die Sedimente gut resuspendiert und anschließend durch 1,5 ml 0,2 N NaOH in 15 Minuten aufgelöst. Nach nochmaliger Fällung mit 1,5 ml 15 % TCA werden die Präzipitate auf Membranfiltern gesammelt (3.12.1.).

3.3.4. Bestimmung der Aufnahme von radioaktiv markierten Nukleosiden in das säurelösliche Material ganzer Zellen ("POOL")

Die wie in 3.3.3. vorbehandelten Zellen werden nach dem Waschen sorgfältig von restlicher Hanks-Lösung befreit, indem die Einmalreagensgläser mit saugfähigem Papier ausgewischt werden. Zu den sedimentierten Zellen werden dann 1,5 ml 5 % TCA gegeben, resuspendiert und die Zellen nach 30 Minuten abzentrifugiert (5 Minuten, 500 g). Vom Überstand wird ein Aliquot zur Radioaktivitätsbestimmung nach 3.12.2. abgenommen. Das Sediment wird wie in 3.3.3. weiterverarbeitet.

3.3.5. Pulsmarkierungen

Die Pulsmarkierung erfolgte unter und nach Anaerobie mit 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin für 10 Minuten, unter und nach Aphidicolinblock mit 20 µCi/ml ^{3}H-Thymidin und unter und nach Methotrexatblock mit 20 µCi/ml ^{3}H-Desoxycytidin für 30 Minuten. Nach Wurster (120) wird unter diesen Bedingungen mehr als 98,5 % der säurefällbaren Radioaktivität in der DNA wiedergefunden. Nicht geblockte Zellen wurden zur Kontrolle mit 20 µCi/ml Kulturflüssigkeit markiert.

Der Einbau wurde durch Einbringen der Zellen in die zehnfache Menge an eiskalter Hanks-Lösung gestoppt, und die Zellen zweimal mit Hanks-Lösung gewaschen.

3.3.6. Dauermarkierungen

Dauermarkiert wurde 2 - 12 Stunden lang mit 1,2 µCi/ml ^{3}H-Thymidin oder 1,6 µCi/ml ^{3}H-Desoxycytidin, wenn die Kulturen geblockt waren. Nicht geblockte Zellkulturen wurden mit 1 - 2 µCi/ml ^{3}H-Thymidin und in Anwesenheit von 2 x 10^{-6} M nicht radioaktiv markiertem Thymidin dauermarkiert.

3.3.7. Radioaktive Markierung mit anschließendem Chase

Nach Puls- oder Dauermarkierung wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem, vorgewärmtem Medium, das 2 x 10^{-6} M Thymidin enthielt, wieder aufgenommen. War die Zellkultur mit Methotrexat geblockt gewesen, dann war das frische Medium supplementiert. Um Temperaturschwankungen zu vermeiden, wurde in einem thermostatisierten Raum gearbeitet. Die Dauer des Chase betrug 2 - 4 Stunden.

3.4. DNA-Isolierung

3.4.1. DNA-Isolierungsmethode A

Die DNA-Isolierung erfolgte nach Helftenbein (25).
200 x 10^{6} gewaschene Zellen wurden in 5 ml SSC aufgenommen und 3 - 4 s am Ultraturrax (Typ 18/2 Janke und Kunkel, Freiburg i. Br.) in der Kälte homogenisiert. Der Ultraturrax wurde mit 5 ml SSC nachgespült, und die Waschflüssigkeit zum Homogenat gegeben. Das rohe Chromatin wurde 20 Minuten bei 10 000 g abzentrifugiert, in 5 ml SSC aufgenommen und der Vorgang noch dreimal wiederholt. Nach dem letzten Homogenisieren wurde mit 1/3 Volumenteil Phenol pH 9 versetzt, das gut verschlossene Zentrifugenröhrchen 1 Stunde bei 70 rpm gedreht und zur Phasentrennung 20 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert. Vor dem sich anschließenden einstündigen RNAase-Verdau (RNAase-"mixture" 50 µl/ml) wurde 3 x gegen 10 l Puf-

fer C jeweils 1 Stunde in der Wärme dialysiert. Zum Verdau mit Proteinase K wurde die Lösung 0,5 % an SDS gemacht und 4 Stunden inkubiert. Der Verdau erfolgte jeweils bei 37° C. Nach nochmaligem Phenolisieren und Dialysieren gegen Puffer C wurde die Lösung 0,3 M an Natriumacetat gemacht, gegebenenfalls 20 Minuten beschallt (Branson Sonifier, Microtip Stellung 7, 10 % Effektivität) und in Portionen mit 2 Volumenteilen kaltem Äthanol bei - 20° C für 60 Minuten gefällt. Durch Beschallen erhält man Fragmente von 500 - 700 Bp ohne größere Anteile an einzelsträngiger DNA (3 - 4 %).

Die DNA-Präzipitate wurden 15 Minuten in der Kälte in der Eppendorfzentrifuge sedimentiert, zweimal mit kaltem, 70 %igem Äthanol gewaschen, kurz im Exsikkator getrocknet und in Puffer aufgenommen.

Äthanolgefällte DNA ist, bei - 20° C gelagert, sehr lange haltbar. Ist sie ^{14}C-markiert, sollte sie im Puffer gelöst eingefroren werden.

3.4.2. Schonende Isolierung von DNA zur Erhaltung und Anreicherung replikativer Strukturen

Die Isolierung erfolgte nach Helftenbein (25) nach folgendem Schema:

Verschieden vorbehandelte Zellen

Kerne

↓

Eco RI-Verdau

↓

Lyse und Proteinase K-Verdau

↓

2 Isopyknische CsCl-Läufe

↓

Dialyse

↓

Behandlung mit Harnstoff und hohem Salz

↓

Phenolisieren
↓
Dialyse
↓
Nitrozellulose-Chromatographie

3.4.2.1. Kernpräparation

Alle Schritte der Kernpräparation erfolgten bei 0 - 4°C. Die zweimal gewaschenen Zellen wurden in Puffer A 58 suspendiert (200 - 300 x 10^6 Zellen/200 ml) und nach 10 Minuten schwellen im Homogenisiergefäß des Ultraturrax T 45 mit Arbeitskopf TP 45 G (Janke und Kunkel) luftfrei homogenisiert.

Zellen aus Kulturen, die anaerob oder längere Zeit mit Hemmstoffen gehalten worden waren, wurden 2 x 20 s auf Stufe 8, Zellen aus aeroben Kulturen 3 x 20 s auf Stufe 10 des Thyristorreglers homogenisiert. Zwischen den Homogenisationsschritten wurde gewartet, bis die Temperatur annähernd 0° C erreicht hatte. Die Kernsuspension wurde dann in zwei 250 ml-Stock-Zentrifugengläsern aufgefangen und sofort bei 4° C in einer Stockzentrifuge auf Stufe 2 10 Minuten abzentrifugiert.

3.4.2.2. Eco RI-Verdau

Das feinverteilte Kernsediment wurde in 60 ml Verdaupuffer E aufgenommen, nochmal abzentrifugiert und im Verdaupuffer E so aufgenommen, daß sich 50 x 10^6 Kerne/ml ergaben. Die Kernsuspension wurde dann in einem Potter bei 37° C mit 36 000 U/ml Eco RI 90 Minuten verdaut, wobei die Kerne etwa alle 10 Minuten durch auf- und abbewegen des Stempels resuspendiert wurden. Der Verdaustop erfolgte durch 20 Volumenteile kalten Stop-Puffer.

3.4.2.3. Lyse und Proteinase K-Verdau

Die verdauten Kerne wurden in der Stockzentrifuge in der Kälte 10 Minuten auf Stufe 6 abzentrifugiert und in 300 µl Stop-Puffer mit einer Kanüle Nr. 9 resuspendiert. In einem ausgewogenen Ti 50 (Beckman) Polyallomer-Röhrchen wurden 1,5 ml Lyse-Puffer, mit 150 µg Proteinase K/ml, vorgelegt und die Kernsuspension bei gleichzeitigem Schütteln zur Durchmischung schnell hineingespritzt. Das verschlossene Röhrchen wurde 16 Stunden im Dunkeln bei 37° C inkubiert.

3.4.2.4. Isopyknische CsCl-Gradienten-Zentrifugation

Die viskose Lösung wurde mit bei 20° C gesättigter CsCl-Lösung in 0,1 SSC vorsichtig unterschichtet, bis das Gewicht des Röhrcheninhalts das 6,85 - 6,9 fache (in g) des vorher darin befindlichen Volumens (in ml) erreichte. Anschließend wurde in einer Beckman Ultrazentrifuge L2-75 mindestens 20 Stunden bei 20° C und 43 000 rpm im Ti 50-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Am Ende des Laufs lief die Ultrazentrifuge bis 5 000 rpm mit Bremse, von da ab ohne Bremse, aus. Der Gradient wurde durch den Boden des Röhrchens nach Anstechen mit einer heißen Kanüle und Nachdrücken mit Paraffin von oben in 0,4 ml Anteilen fraktioniert. Die DNA enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt (meist 4) und in einem Ti 50 Pollyallomer-Röhrchen mit CsCl-Lösung in 0,1 SSC mit ϱ = 1,7 auf 10 - 10,5 g + Röhrchengewicht aufgefüllt, nochmals wie oben zentrifugiert, aber mindestens 36 Stunden zur Erreichung des Gleichgewichts. Es wurde wie oben zentrifugiert, und die gepoolten Fraktionen 2 Stunden gegen 0,1 M TBS (1/5 Tris), über Nacht und nochmal 2 Stunden gegen je 5 l 0,4 M TBS dialysiert.

3.4.2.5. Behandlung mit Harnstoff und Kochsalz

Die DNA-Lösung wurde in ein Christ-Zentrifugenröhrchen überführt, mit festen Substanzen auf 3 M NaCl und 5 M Harnstoff

gebracht und 20 Minuten bei 30 rpm gedreht. Nach der anschließenden Phenolextraktion mit einem Volumenteil Phenol pH 9 (30 Minuten bei 30 rpm drehen) wurde nochmal wie oben dialysiert.

3.4.2.6. Nitrozellulose-Chromatographie (121, 25, 122)

Die Nitrozellulose-Chromatographie erfolgte wie bei Helftenbein (25) beschrieben. Die Nitrozellulose wird in feinen Schichten fest in 1 ml-Plastikspritzen mit unterlegtem Zellulosescheibchen gestopft (Vorbehandlung der Nitrozellulose: Etwa 15 g Nitrozellulose (Firma Wollf, Walsrode) in 1 l H_2O dest. kräftig rühren, absitzen lassen und dekantieren. Den Vorgang solange wiederholen, bis der Überstand klar ist. Lagerung der Nitrozellulose in einem verschlossenen Gefäß über Chloroform. Vor der Verwendung wird 30 Minuten im Wasserstrahlvakuum entgast).

Die Durchlaufgeschwindigkeit wird auf 1 ml/2 Minuten eingestellt und die Säulen mit 10 Säulenvolumen 0,4 M TBS äquilibriert. Nach dem Auftrag werden 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Gewaschen wird mit 5 Säulenvolumina 0,4 M TBS (= TBS-Fraktion), eluiert mit 5 Säulenvolumina 0,4 M TBS enthaltend 0,5 % SDS (= SDS-Fraktion). Die DNA-enthaltenden Fraktionen der TBS- und SDS-Fraktion wurden für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

3.5. Vorbereitung der DNA für die Elektronenmikroskopie

Die Fraktionen der Nitrozellulose-Chromatographie wurden 5 Minuten in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert, um sie von Nitrozellulosepartikeln zu befreien. Da die SDS-Fraktion an Protein angereichert ist, wurde sie danach ein zweites Mal phenolisiert.

Falls die DNA-Konzentration sehr klein war (< 10 µg/ml, mußten die Lösungen eingeengt werden. Dazu wurden sie auf

trockenen und sauberen Sephadex G-25 (Pharmacia) in einem Glasröhrchen mit eingeschmolzener Glasfritte (Ø 2 cm) aufgetragen und nach 30 Minuten Stehen bei 4° C 10 Minuten auf Stufe 6 der Stockzentrifuge durchzentrifugiert (0,4 g G 25/1 ml Lösung engt auf 1/10 des ursprünglichen Volumens ein). Die Ausbeute beträgt etwa 75 %.

Zum Umpuffern wurden 0,5 ml kalter DNA-Lösung auf 0,25 g äquilibrierten Sephadex G 25 in einem Glasröhrchen mit eingeschmolzener Fritte (Ø 0,5 cm) aufgetragen. Nach 30 Minuten wurde 10 Minuten in der Stockzentrifuge auf Stufe 6 zentrifugiert.

Vorbehandlung des Sephadex G 25:

Äquilibrieren in 0,1 M Tris, 0,01 M EDTA, pH 7,8 16 Stunden in der Kälte. Einfüllen in das Glasröhrchen, äußeres Volumen 10 Minuten auf Stufe 6 in der Stockzentrifuge abzentrifugieren.

Die Ausbeute beträgt etwa 70 %.

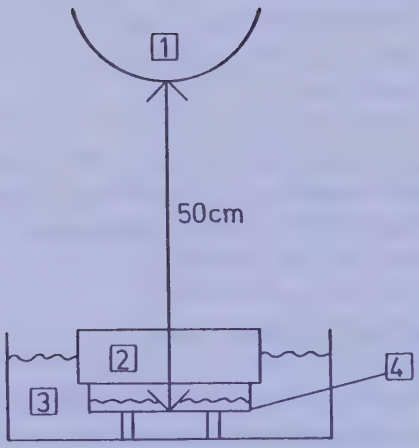
Kleine Volumina von 10 - 200 µl können gegen einen isoosmotischen Puffer auf schwimmenden Membranfiltern (VSWP, Millipore) in einer mit Puffer äquilibrierten Kammer 2 Stunden dialysiert werden (93).

DNA-Lösungen können längere Zeit über Chloroform bei 4° C aufbewahrt werden.

3.6. Vernetzung von DNA in ganzen Zellen mit Trioxsalen

Alle Schritte wurden in der Kälte ausgeführt.

Zweimal gewaschene Zellen wurden in einer Zelldichte von $1 - 2 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert und je 40 ml in eine plane Glasschale gegeben. 200 µl Trioxsalen-Lösung (1 mg/2 ml Äthanol, lichtgeschützt) wurden zugegeben, und es wurde vorsichtig geschwenkt. Nach 2 Minuten Stehen im Dunkeln im Eisbad wurde durch einen Glasdeckel (Duranglas, 2 mm Dicke) 2 Minuten lang mit einer UV-Lampe (Osram, Ultra-Vitalux)bestrahlt. Den Aufbau zur UV-Bestrahlung zeigt das folgende Schema:



[1] UV-Lampe
[2] Duran-Glasdeckel
[3] Eiswasser
[4] Zellsuspension

Der Vorgang ab Zugabe des Trioxsalens wurde 2 - 9 mal wiederholt. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen und konnten weiterverarbeitet werden.

3.7. DNA-Bestimmung mit Bisbenzimidazol (94, 95)

100 µl DNA-Lösung wurden mit 1,8 ml Labarca-Puffer und 100 µl Bisbenzimid-Lösung (1 : 10 verdünnt aus der Stammlösung mit 200 µg/ml in H_2O) versetzt, gemischt und 5 Minuten im Dunkeln stehen gelassen. Gemessen wird die Fluoreszenz bei 458 nm gegen einen Reagenzienleerwert

nach Anregung der Probe bei 356 nm (Fluoro-Colorimeter, JA-7439/A, Aminco). Der Test ist im Bereich von 1 - 10 µg DNA linear.

3.8. Sucrosegradientenzentrifugation

Die Zentrifugationen wurden im Rotor SW 27 der Firma Beckman und TST 28 der Firma Kontron in den Ultrazentrifugen Modell L 2 - 65 B und L 2 - 75 der Firma Beckman durchgeführt.

Die linearen Gradienten wurden mit dem ISCO-Gradientenformer, Modell 570, in Polyallomer-Röhrchen der Firma Beckman und Kontron aufgebaut. Fraktioniert wurde mit einem ISCO-Gradientenfraktionator, Modell 640, durch Unterschichten mit 65 %iger, mit Methylenblau angefärbter, Sucrose. Die Pumpgeschwindigkeit betrug 5 ml/Minute. Die Fraktionsgröße war 1,2 ml.

Die säurefällbare Radioaktivität wurde nach 3.12.3. bestimmt.

3.8.1. Alkalischer Sucrosegradient (80, 23)

Der alkalische Sucrosegradient dient zur Ermittlung der Größenverteilung von Einzelstrang-DNA. Es wurde ein linearer Gradient von 15 - 30 % Sucrose (w/w) aufgebaut, der 0,25 M NaOH, 0,6 M NaCl, 1 mM EDTA und 0,1 % Sarkosyl enthält. Zum Aufbau der 36 ml-Gradienten wurden 0,5 ml 30 %ige Sucroselösung in Polyallomer-Röhrchen von Beckman oder Kontron vorgelegt. Das Auftragsvolumen betrug 1,2 ml. Die Gradienten wurden bei Raumtemperatur aufgebaut und standen vor dem UZ-Lauf 2 - 8 Stunden im Dunkeln. Zentrifugiert wurde entweder 6 Stunden und 26 000 rpm oder 8 Stunden und 23 000 rpm bei 23° C. Beides entspricht derselben Zentrifu-

gationsarbeit. Geeicht wurde mit λ-DNA (2.9.) (kurzer Lauf). Bei der 35 Stunden dauernden Zentrifugation bei 26 000 rpm wurde die Zentrifugationsarbeit über die Zeit berechnet (langer Lauf). S-Wert und Molekulargewicht errechnen sich nach Studier (96) folgendermaßen:

$$\log M = \frac{(\log M + 1{,}277)}{0{,}4} \quad \text{zu } 5{,}4 \text{ S/Fraktion}$$

des kurzen Laufs.

Das mittlere Molekulargewicht, bezogen auf die Radioaktivität, errechnet sich wie folgt:

$$\bar{M}_W = \frac{\text{cpm}_i \times M_i}{\text{cpm}}$$

Das mittlere Molekulargewicht, bezogen auf die Teilchenzahl, errechnet sich wie folgt:

$$\bar{M}_n = \frac{\text{cpm}}{\text{cpm}_i / M_i}$$

"i" bezeichnet die Fraktion des Gradienten.

3.8.2. Probenlyse auf dem alkalischen Sucrosegradienten (80)

Zunächst wurden 500 µl Lyse Lösung (10 mM EDTA in 1 % Sarkosyl) aufgetragen und anschließend die gewaschenen und in 200 µl Hanks-Lösung resuspendierten Zellen oder Kerne. Nach 20 Minuten Lyse im Dunkeln wurde mit 0,5 ml einer Lösung von 0,2 M EDTA, 1 M NaOH überschichtet und zur Freisetzung und Entwindung auch hochmolekularer DNA 6,5 - 7 Stunden im Dunkeln stehengelassen, bevor die Ultrazentrifuge gestartet wurde. Bei kurzen Läufen (6 oder 8 Stunden) wurden 200000 - 300000 Zellen bei langen Läufen (35 Stunden) bis zu 10^6 Zellen aufgetragen.

3.9. DNA-Faserautoradiographie

3.9.1. Vorbereitung der Objektträger

Die Objektträger (70 x 26 mm) wurden mit einem Diamantschreiber numeriert, 16 Stunden in Nitriersäure (2.3.) gereinigt, gespült, getrocknet und gelatinisiert. Dazu werden 0,5 g Gelatine bei 60° C in 100 ml H_2O gelöst und 0,05 g Chromalaun zugesetzt. 200 ml dieser Lösung gibt man in einen Glastrog, in den nacheinander bis zu 30 Objektträger jeweils 5 s eingetaucht werden können. Die gelatinisierten Objektträger werden über Nacht getrocknet.

3.9.2. Markierung und Vorbereitung der Zellen

Die Markierung der Zellen erfolgte nach einem heiß/warm Schema (97, 98). Die Zellen werden zunächst mit ^{3}H-Thymidin in einer Konzentration von 1 x 10^{-6} M markiert. Dann wird die 10-fache Menge an nicht radioaktiv markiertem Thymidin zugegeben, so daß die Konzentration an ^{3}H-Thymidim auf etwa 1/10 verringert wird. Dazu wurden 80 µCi ^{3}H-Thymidin in Gläsern eingetrocknet, und 1 ml der jeweiligen Zellkultur unter den verschiedenen Bedingungen (unterschiedliche Temperatur, Hemmstoff) dazugegeben. Nach der gewünschten "heißen" Markierungszeit (zwischen 30 und 90 Minuten) wurden 100 µl einer 10^{-4} M Thymidin-Lösung in Medium zupipettiert und für dieselbe Zeit "warm" markiert. Der Markierungsstop erfolgte durch Eingießen in 10 ml kalte Hanks-Lösung. Die Zellen wurden gewaschen und in PBS def in einer Zelldichte von 150 000 - 200 000 Zellen/ml aufgenommen.

3.9.3. Ausstreichen der Zellen

50 µl der in PBS def suspendierten Zellen werden auf das beschriftete Ende des vorbereiteten Objektträgers pipettiert,

daneben 50 µl von Lyse-PBS def Die beiden Tropfen werden vorsichtig mit einem gewinkelten Glasstab vermischt und nach 1 Minute über den schräg gestellten Objektträger ausgestrichen. Nach etwa 3 Stunden Trocknen an der Luft wird die lösliche Radioaktivität durch 2 x 5 Minuten Eintauchen in kalte 5 % TCA und 3 Minuten Eintauchen in kaltes Äthanol herausgewaschen. Die Objektträger sind schnell trocken. Pro Probe wurden etwa 5 Objektträger ausgestrichen.

3.9.4. "Dippen", Exposition und Entwicklung der Objektträger

Die Objektträger wurden mit Nuclear Research Emulsion K 5 überzogen (99, 80). Dazu wurde in einem dunklen Raum mit sehr schwachem Rotlicht gearbeitet. Die Emulsion darf nur im Dunkeln aus der Flasche genommen werden. Sie muß, bevor sie benutzt werden kann, bei 45° C im Wasserbad geschmolzen werden und wird dann 1 + 1 mit Wasser verdünnt und vorsichtig durchmischt. Einmal geschmolzene Emulsion kann nicht wiederverwendet werden.

Ein "Dippgefäß" wird mit dieser Emulsion blasenfrei gefüllt und je 2 Objektträger Rücken an Rücken kurz eingetaucht und zügig wieder herausgezogen. Zum Trocknen werden die Objektträger fast senkrecht für 3 Stunden aufgestellt, um sie dann in einem lichtdichten Beutel mit getrocknetem Silikagel (1 Stunde, 200° C) zu verpacken. Die Lagerung erfolgte bei 4° C während 7 und 10 Monaten. Entwickelt wurde 10 Minuten mit Kodak D 19, gestoppt mit 2 % Essigsäure für 2 Minuten und fixiert mit saurem Fixiersalz für 10 Minuten. Nach 60 Minuten Wässern wurden die Objektträger an der Luft getrocknet.

3.9.5. Fotographische Arbeiten (80)

Fotografiert wurde durch ein Olympus BH Mikroskop mit Olympus Fotookular 10 x und Zeiss Objektiv Plan 10/0,22/160/-, mit montierter Canon AE 1 mit Winkelsucher. Belichtet wurde 1/30 s mit abgedecktem Sucher, Lampe auf Lichtstärke 5.5, Lichtfeldblende etwa auf 15, Kondensor oben, Kondensorblende etwa zu 2/3 geöffnet, ohne Phasenkontrast mit einem Grünfilter. Die belichteten Negativfilme wurden 3 Minuten in Neutol bei 20° C entwickelt, kurz zwischengewässert und 10 Minuten fixiert. Der Vergrößerungsmaßstab wurde durch die Aufnahme einer Neubauerzählkammer ermittelt.

3.9.6. Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie bei Gekeler (80) beschrieben. Bei "pre-pulse"-Initiationen hat die Replikation schon vor der Markierung begonnen, bei "post-pulse"-Initiationen während der "heißen" Markierung. "Heiße" und "warme" Markierung werden durch ihre unterschiedliche Silberkorndichte unterschieden. Die Laufrichtung einer Gabel ist in Richtung abnehmender Silberkorndichte.

"pre-pulse"-Initiationen - - - - —— —— - - - -
"post-pulse"-Initiationen - - - - ———— - - - -

Um Fehler bei der Auswertung zu vermeiden, werden nur diese Figuren, möglichst innerhalb benachbarter Replikons, oder Teilen davon, ausgewertet. Zur Bestimmung der Gabelgeschwindigkeit werden die stark markierten Strecken der "pre pulse"-Initiationen ausgemessen. Die Interinitiationsabstände werden zwischen den postulierten "origins" der "pre-pulse"- und "post-pulse"-Initiationen gemessen.

3.10. Elektronenmikroskopische Methoden

Trägerfilme aus Nitrozellulose werden nach Bäzner (100) hergestellt.

Alle verwendeten Lösungen wurden durch einen Spritzenaufsatz sterilfiltriert:

Wässrige Lösungen: Typ GSTF (Millipore) 0,22 µm Porengröße
gemischter Zelluloseester

Äthanolische Lösungen: Typ EGWP (Millipore) 0,2 Porengröße
Zellulosetriacetat

3.10.1. Diffusionsmethode (101, 102)

Diese Methode ist geeignet für Lösungen geringer DNA-Konzentration, da die an die Oberfläche adsorbierte DNA-Menge von der Diffusion der Moleküle an die Tropfenoberfläche abhängig ist. Die Diffusionszeit kann bis zu 5 Stunden ausgedehnt werden. Im Gegensatz zur Spreitungsmethode sind die Moleküle weniger Zug ausgesetzt, so daß sie im elektronenmikroskopischen Bild weniger gestreckt erscheinen als in der Spreitungsmethode, und auch eventuelle zugempfindliche Stellen erhalten bleiben. Außerdem ist sie technisch einfacher und wurde daher meistens verwendet.

Ein Standardansatz von 30 µl enthält:

	Endkonzentrationen
1 µl Cytochrom c-Lösung, 40 µg/ml	1,3 µg/ml
1 µl Formaldehyd-Lösung, 8 %	0,27 %
2 µl Ammoniumacetat-Lösung, 0,6 M pH 7	0,14 M
1 µl DNA-Lösung 10 µg/ml	0,1 µg DNA/ml
25 µl H_2O bidest	

Dieser 30 µl Tropfen wurde auf einer sauberen Teflonplatte in einer mit 0,14 M Ammoniumacetat, 0,27 % Formaldehyd pH 7 äquilibrierten Kammer 60 - 120 Minuten zur Diffusion belassen.

3.10.2. Präparation für die Diffusion nach Denaturierung der DNA (113)

Sie wurde verwendet, um den Quervernetzungsgrad der DNA nach Trioxsalen-Quervernetzung zu bestimmen. Die DNA wurde gleichzeitig denaturiert und durch Glyoxalbehandlung (103) am Renaturieren gehindert, wodurch sich keine Probleme beim Präparieren ergeben. Nicht quervernetzte DNA war nach dieser Behandlung einzelsträngig.

Ein Denaturierungsgemisch enthielt:

10 µl DNA-Lösung
73 µl Formamid
10 µl 0,1 M Na-PO_4, 0,01 M EDTA pH 6,9
7 µl 40 % Glyoxal (Trimeres Dihydrat von Sigma, 73 mg + 100 µl Wasser kurz gekocht)

Nach 45 - 60 Minuten bei 37° C wurde der Ansatz direkt zur Präparation nach der Diffusionsmethode eingesetzt.

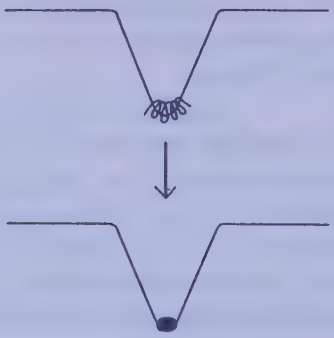
Die an der Oberfläche des Tropfens adsorbierte DNA wurde durch kurzes Antippen mit einem befilmten Trägernetzchen abgenommen und konnte anschließend gefärbt und bedampft werden.

3.10.3. Färben und Schrägbedampfen

Nach dem Belegen der Trägernetzchen wurden diese 30 s in Uranylacetat-Lösung und 5 s in 90 %igem Äthanol geschwenkt.

Zum Trocknen werden sie mit der befilmten Seite nach oben auf Filterpapier gelegt.

Die Schrägbedampfung mit Pd : Pt-Draht erfolgte in einer Edwards-E 306 A-Hochvakuumbedampfungsanlage. Dazu wurden die Trägernetzchen auf einen drehbaren Halter aufgebracht, der sich im Winkel von 7° zur Bedampfungsquelle befand. Der Abstand Bedampfungsquelle - Halter betrug 15 cm. Als Bedampfungsquelle diente eine mit 7 cm der Edelmetall-Legierung umwickelte Haarnadel aus Wolfram-Draht.



Das Vakkum vor Beginn der Bedampfung betrug 8×10^{-6} atm. Die Bedampfung erfolgte während 10 Minuten nach Schmelzen des Pd : Pt-Drahtes.

Grundsätzliches über die Methoden und damit verbundene Probleme findet sich bei Bäzner (100).

3.10.4. Bilder und Bildauswertung

Die Bilder am EM 109 wurden mit der Außenkamera (Transfaseroptik) mit einer Belichtungsautomatik aufgenommen. Die Negativfilme wurden bei 20° C folgendermaßen entwickelt: 15 Minuten Schwenken in Ilford Perceptol, nach Angaben des Herstellers für Einmalbenützung verdünnt, 1 Minute zwischenwässern, 10 Minuten fixieren, 60 Minuten wässern.

Die Vergrößerung des Elektronenmikroskops wird vom Hersteller angegeben.

Weitere Meßfehlerquellen wurden nach Bäzner (101) nicht berücksichtigt.

Längenmessungen wurden zum einen gemacht, wie von Bäzner (101) beschrieben, durch Projektion der Negative mit einem umgebauten Leitz 6 x 6 Diaprojektor auf das Meßblatt eines Digitizers (MOB, Kontron) auf eine Fläche von 70 x 110 cm. Die Längen wurden mit einem Cursor gemessen und direkt auf einen HP 9831 A Tischcomputer übertragen. Ein existierendes Datenübernahmeprogramm wurde übernommen, welches die Daten speicherte und die Mittelwerte der gemessenen Längen berechnete (101).

Andererseits wurden Moleküle nach Projektion der Negative, mittels eines Durst-Projektors M 805, mit bekanntem Vergrößerungsmaßstab abgezeichnet, und anschließend mit einem Cursor an einem Zeiss-Kontron IBASF mit Fortran Standard-Meßprogramm vermessen und verarbeitet. Dazu wurden die Meßlängen in angemessene Klassen eingeteilt und die Anzahl der Ereignisse in jeder Klasse aufsummiert. Aus dieser Verteilung wurden die arithmetischen Mittelwerte berechnet.

Um die Anzahl replikativer Strukturen in den DNA-Präparationen zu bestimmen, wurden Moleküle direkt beim Mikroskopieren gezählt und die Anzahl ohne solche Strukturen und

solche mit Strukturen protokolliert. Alternativ wurden Bereiche abfotographiert und die Moleküle, nach Projektion der Negative oder nach Herstellen von Positiv-Bildern, gezählt.

3.11. Aufnahme einer Reassoziationskinetik (115, 116)

3.11.1. Vorbereitung der DNA

Synchronisierte Zellen wurden im alkalischen Sucrosegradienten, nach Lyse der Zellen auf dem Gradienten, zentrifugiert. Nach Fraktionierung der Gradienten wurde die säurefällbare Radioaktivität nach 3.12.3. eines Gradienten bestimmt und die 4 - 10 Radioaktivität enthaltenden Fraktionen neusynthetisierter DNA aus einem Gradienten gepoolt (s. Abb. 31). Die gepoolten Fraktionen wurden beschallt (Branson Sonifier, Microtip, Stellung 7, 10 % Effektivität, 20 Minuten), gegen 3 x 10 l TE jeweils mindestens 2 Stunden dialysiert und mit Butanol auf etwa 1 ml eingeengt (114). Nach einer weiteren Dialyse gegen 2 x 10 l TE wurde die Probe 0,3 M an Natriumacetat gemacht und mit 10 µl ^{14}C-Maus-Gesamt-DNA (3.3.1., 3.4.1.) (Stammlösung: 1 mg/ml in 0,3 M Natriumacetat) auf 1 µg/ml versetzt. Gefällt wurde mit 2 Volumenteilen Äthanol bei - 20° C während 16 Stunden. Das Präzipitat wurde 30 Minuten bei 23 000 rpm im SW 40-Rotor (Beckman) bei 0° C abzentrifugiert, getrocknet und in 200 µl 0,3 M Natriumacetat gelöst.

DNA für große $c_o t$-Werte, ab $c_o t = 10^2$, wurde mit 20 µg unmarkierter Gesamt-DNA pro Probe versetzt (Gesamt-DNA isoliert von Schüle nach (114) und beschallt wie oben). Nach einer weiteren Äthanolfällung, wie oben, wurde die DNA für kleine $c_o t$-Werte, $c_o t < 10^2$, in 0,12 M PB aufgenommen, so daß sich eine Konzentration an ^{14}C-Gesamt-DNA von 1 µg/20 µl ergab. Entsprechend wurde DNA für große $c_o t$-Werte in 0,4 M PB aufgenommen, so daß sich eine Konzentration an ^{14}C-DNA von 20 µg/20 µl ergab.

Die DNA eines Gradienten wurde auf insgesamt 10 Ansätze verteilt und enthielt etwa jeweils 1 000 cpm ^{3}H-Thymidin- und ^{14}C-Thymidin-cpm. Das Verhältnis von ^{3}H- und ^{14}C-markierter DNA war 1 : 1 000.

Je 20 µl der DNA-Proben wurden auf Eppendorfcups mit dichtschließendem Schraubdeckel verteilt. Um ein Verdampfen der Flüssigkeit im Eppendorfcup bei längerer Inkubation zu vermeiden, wurde ab $c_o t = 10^3$ mit in Puffer äquilibriertem Parrafinöl überschichtet.

Zur Denaturierung der DNA wurden die Proben 10 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend in einem 60° C-Wasserbad zur Renaturierung belassen.

Nach Ablauf der verschiedenen Renaturierungszeiten erfolgte der Renaturierungsstop durch schnelles Pipettieren der Probelösung in 2 ml 60° C-warmen 0,12 M PB. Die mit Paraffin überschichteten Proben wurden vor der HA-Chromatographie von diesem befreit. Dazu wurde das überschichtete Paraffin abpipettiert, die Probe mit 0,5 ml 0,12 M PB versetzt, mit 1 ml Chloroform extrahiert, die Oberphase abgenommen und nochmal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Restliches Chloroform wurde in der Speed Vac abgezogen (5 Minuten). Nach Zugabe von 1,5 ml 0,12 M PB (60°C) waren die Proben für die HA-Chromatographie vorbereitet. Der Zeitbedarf für die Paraffinentfernung war 15 Minuten, was maximal einen Fehler von 1,1 % ausmacht, wenn man die Verdünnung auf 1/25 sofort nach Ablauf der Renaturierungszeit nicht berücksichtigt.

3.11.2. HA-Chromatographie

Benützt wurde HA, der von Frenzel-Stötzer nach Bernardi (117) hergestellt worden war, und der bei 4° C über Chloroform aufbewahrt wurde.

Vorbereitung der Säulen:

Verwendet wurden Pasteurpipetten, deren eng zulaufendes unteres Ende mit Glaswolle gefüllt wurde, und die nach unterlegen eines Papierscheibchens mit HA-Suspension überschichtet wurden. Für 1 µg DNA betrug das Säulenvolumen 200 µl und für 20 µg DNA 400 µl, womit die Kapazität der Säule maximal zu einem Viertel beansprucht wird.

Die Säulen wurden mit mindestens 10 Säulenvolumina 0,12 M PB gewaschen und 10 Minuten vor Benützung im 60° C-Wasserbad äquilibriert. Alle Schritte der Chromatographie erfolgten bei 60° C.

Kurz vor dem Probenauftrag läßt man die Säulen leerlaufen, und weiterhin ebenfalls nach jedem Auftrag. Gewaschen wurde mit 2 ml bzw. im Fall der 400 µl-Säulen mit 4 ml 0,12 M PB und der aufgefangene Durchlauf wurde als ss-Fraktion bezeichnet. Die ds-Fraktionen wurden mit 2 bzw. 4 ml 0,4 M PB eluiert und die Radioaktivität der Fraktionen nach 3.12.3. bestimmt.

3.12. Radioaktivitätsbestimmungen

Alle Proben wurden in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler Tri-Carb Typ 2450 der Firma Packard Instruments gemessen. Bei allen Meßreihen wurde ein Leerwert mitgezählt und von den gezählten Impulsen abgezogen.

3.12.1. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität ganzer Zellen

Die nach 3.3.3. vorbehandelten Proben werden auf Membranfiltern gesammelt. Falls die Zählausbeute bestimmt werden soll, werden sie nach 3.12.4. weiterbehandelt. Ansonsten

werden die getrockneten Filter (20 Minuten, 80° C) mit 5 ml Toluol-Szintillator ausgezählt.

3.12.2. Bestimmung der säurelöslichen Radioaktivität ganzer Zellen

Von den nach 3.3.4. vorbehandelten Proben wird ein Aliquot in 10 ml Triton-Szintillator gegeben, gut gemischt und ausgezählt. Soll die Zählausbeute bestimmt werden, wird anschließend mit demselben Isotop radioaktiv markiertes Toluol bekannter Zerfallsrate zugegeben und nochmals ausgezählt.

3.12.3. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität von DNA in wässriger Lösung

Die Proben werden mit 1/5 Volumenteil Carrier-DNA und mit 50 % TCA versetzt, so daß ein 5 %iger Säureüberschuß vorhanden ist. Nach 30 Minuten bei 0° C wurden die Präzipitate auf Membranfiltern gesammelt und wie in 3.12.1. weiterverarbeitet.

3.12.4. Bestimmung der absoluten Radioaktivität säuregefällter Zellproben

Präzipitierte DNA wird auf Glasfaserfiltern abgesaugt, getrocknet und in Szintillationsgefäße 16 Stunden bei 37° C mit 0,5 ml Hyamine von den Filtern abgelöst. Nach Zugabe von 10 ml Toluolszintillator werden die Proben ein erstes Mal und nach Zugabe von mit demselben Isotop markierten Toluol bekannter Zerfallsrate ein zweites Mal gezählt.

Die Zerfälle pro Minute berechnen sich dann wie folgt:

$$dpm_{Probe} = cpm_{Probe} \times \frac{dpm\ Standard}{cpm_{Probe + Standard} - cpm_{Probe}}$$

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Synchronisation der Zellen zur Anreicherung initiierender Zustände

4.1.1. Wirkung von Sauerstoffentzug

4.1.1.1. Einleitung

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß Sauerstoffentzug die DNA-Synthese und die Proliferation eukaryontischer Zellen unterhalb einer Schwellenkonzentration von 0,37 % des Sauerstoffpartialdrucks hemmt (38, 39, 128). In verschiedenen Systemen wurde dabei eine Akkumulierung der Zellen in der G1-Phase beobachtet (128, 129, 126, 127). Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in der G2- und M-Phase behalten unter Anaerobie die Fähigkeit sich zu teilen und in die G1-Phase einzutreten (127). Zellen in der S-Phase treten in G2 ein. Nach Wiederbelüften treten G1-Zellen in die S-Phase ein (130). Je nach Bedingungen kann dies sofort (80) oder verzögert (38) sein. S-Phasenzellen beginnen nach 12 Stunden Anaerobie erneut mit der DNA-Synthese, so daß die Zellen einen DNA-Gehalt von 4 c aufweisen. Frühe und späte S-Phasenzellen reagieren auf Anaerobiose unterschiedlich. Nach 8 Stunden Anaerobiose tritt eine Verzögerung der Zellzyklusprogression früher S-Phasenzellen ein, späte S-Phasenzellen beschleunigen nach 4 Stunden Anaerobie ihre S-Phasenprogression und beginnen nach 8 Stunden Anaerobie teilweise ein neues S-Phasenprogramm (127, 131). Die Wirkung von Anaerobie auf die einzelnen Schritte der DNA-Replikation in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen wurden von Gekeler (80) genauer untersucht. Er konnte zeigen, daß durch Anaerobie die Initiationshäufigkeit abnimmt. Die Elongation bereits

laufender Gabeln und die Reifung der Tochterstränge waren nicht in starkem Ausmaß betroffen. Anaerobie führte zu einer etwa 60 %igen Hemmung der RNA- und Proteinbiosynthese (38, 39). Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, daß die Abnahme dieser und anderer biosynthetischer Leistungen auf einen Energiemangel der Zellen zurückgeführt werden kann. Der ATP-Gehalt nimmt zwar unter Anaerobie ab, aber nicht in einem solchen Ausmaß, daß er für die beobachteten Effekte verantwortlich gemacht werden könnte.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Wirkung des Sauerstoffentzugs auf die DNA-Replikation wurde die Vorstellung der Kopplung an eine funktionierende Atmungskette entwickelt. Dazu liegen Untersuchungen vor, die sich mit dem Einfluß von Hemmstoffen und Entkopplern beschäftigen. Krause et al. (38) konnten zeigen, daß das Wiederanspringen der DNA-Synthese nach Aufheben des Anaerobieblocks durch 2,4-Dinitrophenol vollständig unterdrückt werden kann. Ebenso konnte Gautschi (132) die Initiation von Replikationseinheiten in Hela-Zellen durch 2,4-Dinitrophenol unterdrücken. Yoshida AH 130 Hepatomzellen treten aber nach Block durch Anaerobiose oder Antimycin A trotz Entkopplung der Atmungskette mittels 2,4-Dinitrophenol in die S-Phase ein (33).

Hemmstoffe der Atmungskette (Antimycin, Cyanid, 2-Thenoyltrifluoracetat, Anaerobie) und der Hemmstoff der Dihydroorotatdehydrogenase, Dihydro-5-azaorotsäure, hemmen den Eintritt von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in die S-Phase (34, 37). Die Dihydroorotatdehydrogenase ist auf der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und ist mit der Elektronentransportkette gekoppelt, auf die sie Elektronen über Ubiquinon überträgt. Ihr Substrat ist Dihydroorotat, das zu Orotat oxidiert wird. Orotat ist über Uridinmonophosphat Vorläufer der Pyrimidinnukleotide. Die Vorstellung, daß die Hemmung der DNA-Synthese durch einen Mangel an Pyrimidinnukleotiden verursacht wird, unterstützen folgende Befunde:

- Durch Dihydro-5-azaorotsäure in der G1-Phase akkumulierte Zellen treten nach Substitution mit Uridin in die S-Phase ein (34).

- Unter Anaerobie nimmt der dCTP-Pool von G1-Zellen auf ein Drittel bis ein Viertel ab; die Zellen bleiben in der G1-Phase. Supplementation mit dCyt führt zu einem Anstieg des dCTP-Pools und des dTTP-Pools und dem Eintritt der Zellen in die S-Phase (35). Thymidin, Cytidin und Uridin haben keine Wirkung. Der Einfluß der Ribonukleotidreduktase, die aerobe Bedingungen für ihre Aktivität braucht, wurde diskutiert.

- 1 µM Antimycin verhindert den Eintritt von G1-Zellen in die S-Phase. Durch Supplementation mit Uridin, Cytidin oder Desoxycytidin läßt sich die Antimycinwirkung aufheben (37).

- Der dCTP-Pool ist in G1-Zellen niedrig (133) und steigt beim Eintritt in die S-Phase an.

Von Gekeler (80) konnten mittels Zonalzentrifugation selektionierte G1-Zellen mit anschließender zwölfstündiger Anaerobiose an der G1/S-Phasengrenze synchronisiert werden. Nach Blockaufhebung traten die Zellen in die S-Phase ein. Diese Methode wurde auf ihre Anwendbarkeit zur Anreicherung synchroner Repklikationseinheiten geprüft, da sie versprach, ohne die störenden, und zum Teil unbekannten Einflüsse von Antimetaboliten und Hemmstoffen auf die Zellen auszukommen. Sie sollte einen schnell reversiblen Block des Eintritts in die S-Phase von G1-Zellen bewirken. Die Vorstellung war, daß nach Blockaufhebung zunehmend mehr Replikons aktiviert werden.

4.1.1.2. Verlauf der DNA-Synthese-Aktivität

Die DNA-Synthesehemmung unter Anaerobie wurde zunächst an selektionierten G1-Zellen verfolgt. Die Zellen wurden nach

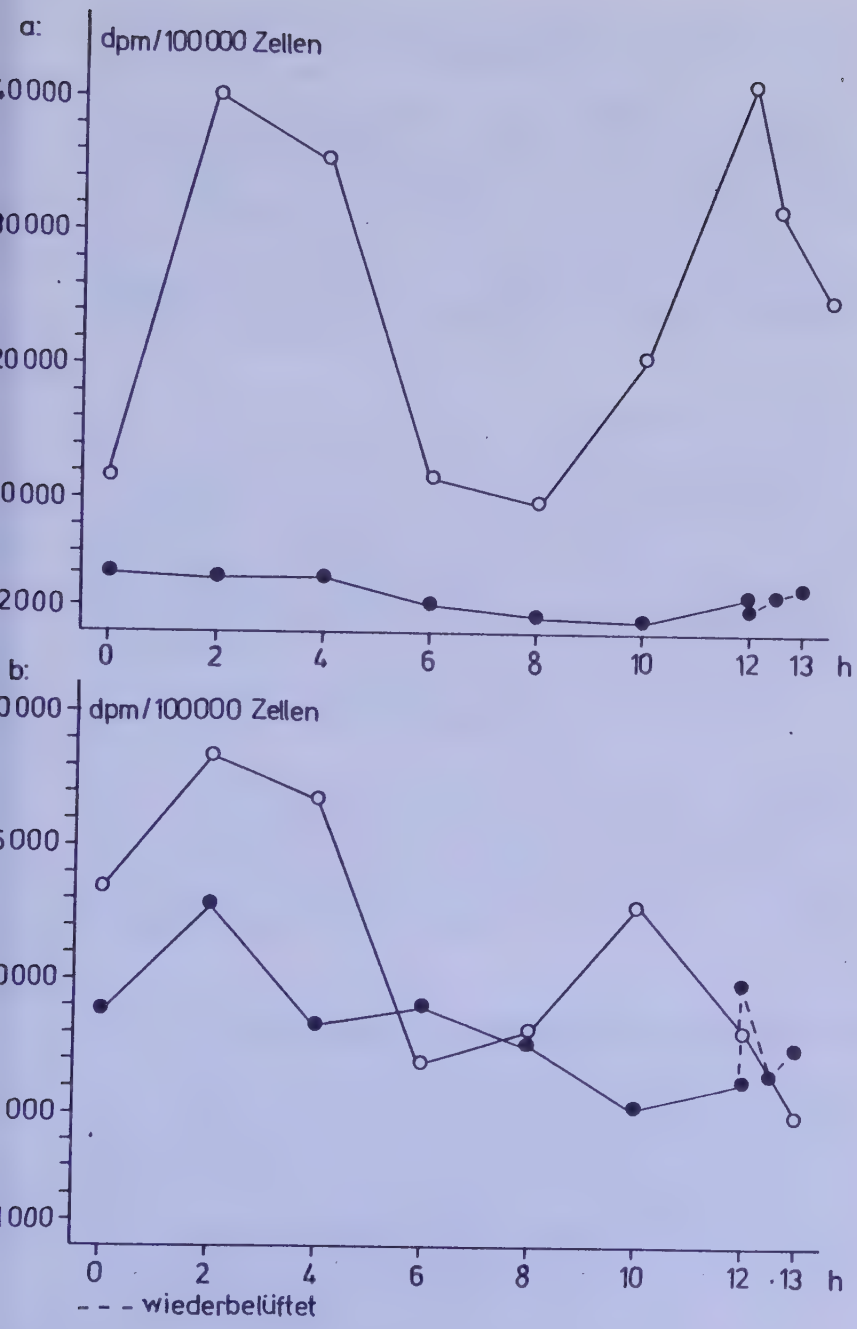

a:
dpm/100000 Zellen
0 2 4 6 8 10 12 13 h
b:
dpm/100000 Zellen
0 2 4 6 8 10 12 13 h
- - - wiederbelüftet

Abb. 2: Verlauf der DNA-Syntheseaktivität selektionierter G1-Zellen unter Anaerobie.

Selektionierte G1-Zellen (●) und asynchrone Zellen desselben Ausgangsmaterials (○) wurden in Kultur genommen. Die G1-Zellkultur wurde anaerobisiert und nach 12 Stunden nach 3.1.5. wiederbelüftet. Sofort nach Einsaat und alle weiteren 2 Stunden wurde nach 3.3.3., 3.3.4. und 3.1.7. 10 Minuten pulsmarkiert. Es wurde jeweils der Einbau in säurefällbare Radioaktivität (a) und die Aufnahme in den "Pool" (b) nach 3.12.1. und 3.12.2. bestimmt.

---

der Zonalzentrifugation (3.2.1.) in Kultur genommen und alle 2 Stunden nach 3.3.3., 3.3.4. und 3.1.7. 10 Minuten pulsmarkiert. Aus den entnommenen 1 ml-Aliquots wurde der Einbau in säurefällbare Radioaktivität im Pool nach 3.12.2. bestimmt (Abb. 2 a). Parallel dazu wurden dieselben Bestimmungen an einer asynchronen Kultur der Ausgangszellen gemacht (Abb. 2 b).

Die G1-Zellen der anaerobisierten Kultur bauen anfangs bis zu 4 Stunden etwa gleiche Mengen an ^{3}H-Thymidin in DNA ein. Erst dann fällt der Einbau ab, um zwischen 6 - 8 Stunden seinen tiefsten Stand zu erreichen. Nach dem Aufheben der Anaerobie steigt der Einbau innerhalb der ersten Stunde an. Die Radioaktivität im Pool nimmt ebenso bis 10 Stunden nach Einsaat langsam ab. Nach Blockaufhebung steigt der Pool sofort an und fällt 30 Minuten später wieder ab. Diese Schwankungen spiegeln sich in der säurefällbaren Radioaktivität nicht wieder.

Die Aufnahme von Radioaktivität in säurefällbares Material und in den Pool der asynchronen Zellen ist starken Schwankungen unterworfen. Die Schwankungen haben ihre Parallele in der säurefällbaren Fraktion, sind dort aber größer. Der Einbau von ^{3}H-Thyimidin ist in der asynchronen Kontrollkultur nur dreimal größer, was auf einen Anteil S-Zellen in den selektionierten G1-Zellen hindeutet. Reparaturvorgänge, die ja ständig in den Zellen ablaufen, dürfen ebenfalls nicht unbeachtet bleiben. Nach Helftenbein (25) werden sie aber unter Anaerobie teilweise unterdrückt.

Durch Anaerobieblock von G1-Zellen ist also kein vollständiger Stillstand der DNA-Syntheseaktivität erreichbar. Eine Restaktivität, etwa durch laufende Replikationsgabeln verschleppter S-Zellen oder durch nicht durch Anaerobie beeinflußbare Zellen, ist vorhanden.

4.1.1.3. Stimulierung der DNA-Synthese durch Wiederbelüften

Nach Aufheben des Anaerobieblocks sollten die Zellen nach Gekeler (80) sofort in die S-Phase eintreten oder ihre DNA-Syntheseaktivität wieder aufnehmen. Asynchrone Zellen wurden dazu nach in vivo-Vormarkierung mit ^{14}C-Thymidin 2 Stunden in Kultur genommen und dann anaerobisiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde aerobisiert (Abb. 3 a, b). Zu den

angegebenen Zeiten wurden 1 ml Aliquots nach 3.1.6. entnommen und der Einbau in säurefällbare Radioaktivität nach 3.3.3. und 3.12.1. verfolgt. Die DNA-Syntheseaktivität nahm wie erwartet ab und stieg nach Blockaufhebung wieder an. Erwartet wurde ein Wiederanstieg über den Kontrollwert hinaus nach 1 - 2 Stunden, und eine mit der Anaerobiezeit bessere Stimulierung. Dies war nicht immer reproduzierbar und schwankte stark zwischen 10 und 99 % des Kontrollwertes. Erreichte der Wiederanstieg nach 2 Stunden den Kontrollwert, dann war auch die Zellkultur mit zunehmender Anaerobiezeit besser aufhebbar. War das nicht der Fall, dann liessen sich die Zellen mit der Zeit immer schlechter stimulieren.

Nach 12 Stunden Anaerobiose selektionierter G1-Zellen erreicht die DNA-Syntheseaktivität nach 6 Stunden Aerobie 50 % des Anfangswertes, was etwa 35 % des Kontrollwertes entspricht (Abb. 3 c).

Eine Vergiftung der Kultur mit Kohlenmonoxid über den Kupferkatalysator (80) konnte ausgeschlossen werden, da der Verlauf der DNA-Synthesehemmung anders war (nicht gezeigt). Ebenso verhält sich die Zellkultur in Medien mit Seren aus verschiedenen Quellen identisch. Ein ganz ähnliches Verhalten wurde von Krause et al. (38) beobachtet.

Da in der Zelle viele sauerstoffabhängige Prozesse ablaufen, wie die Biosynthese von Porphyrinen, Cholesterin, ungesättigten Fettsäuren, Prostaglandinen, Tyrosin, Hydroxyprolin und Uridin, ebenso der Abbau von Purinen, Polyaminen und aromatischen Aminosäuren, war es denkbar, daß die Zellen durch kompletten Sauerstoffentzug geschädigt werden. Unter hypoxischen Bedingungen, unter Einhaltung der Schwelle von 0,37 % Sauerstoff, bezogen auf den Partialdruck, sollte ebenfalls ein DNA-Syntheseblock möglich sein. Deshalb wurde eine in vivo mit ^{14}C-Thymidin vormarkierte asynchrone Zellkultur mit einem Gasgemisch begast, das etwa 0,1 % Sauerstoff, bezogen auf den Partialdruck in Luft, in Ar/CO_2 enthielt.

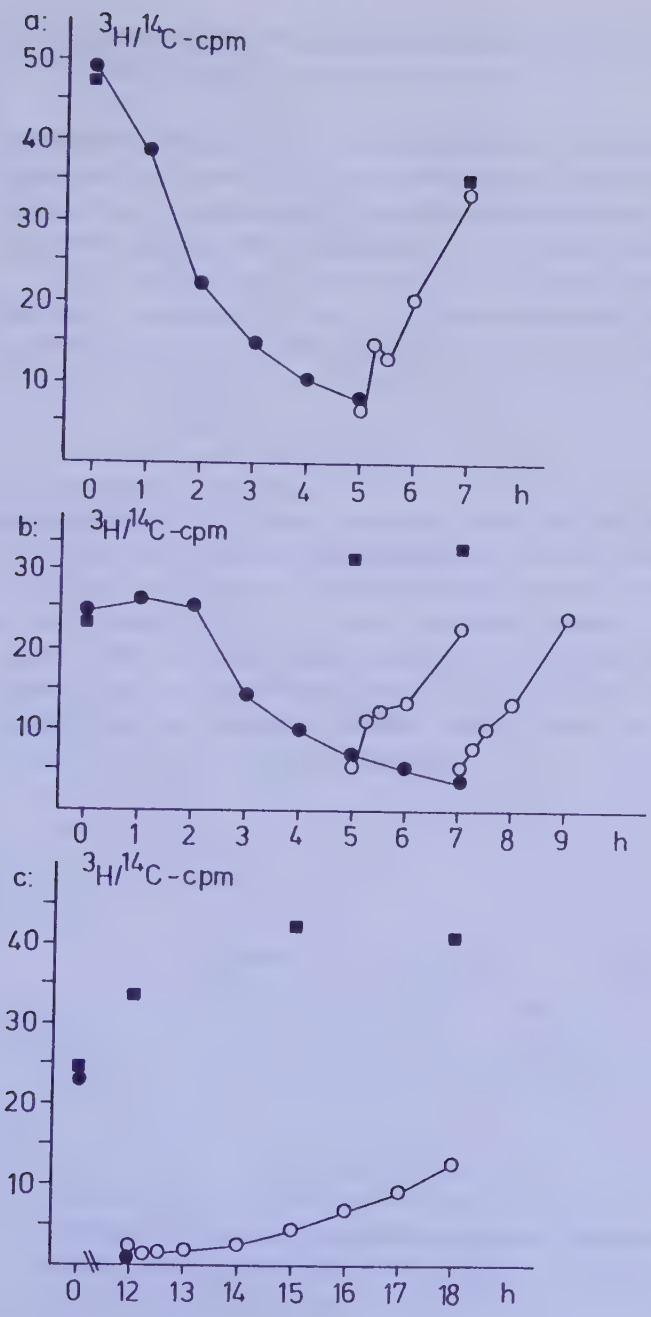

a:
$^3H/^{14}C$-cpm
50
40
30
20
10
0 1 2 3 4 5 6 7 h
b:
$^3H/^{14}C$-cpm
30
20
10
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 h
c:
$^3H/^{14}C$-cpm
40
30
20
10
0 12 13 14 15 16 17 18 h

Abb. 3 a, b, c: Stimulierung der DNA-Synthese nach Wiederbelüften anaerober Zellkulturen.

Nach in vivo-Vormarkierung mit ^{14}C-Thymidin wurden die Zellen in Kultur genommen und nach 2 Stunden anaerobisiert. Zu den verschiedenen Zeiten wurden 1 ml-Aliquots entnommen (3.1.6.) und nach 3.3.3. radioaktiv markiert; anaerobe Kultur, ● ; wiederbelüftete Kultur, ○ ; aerobe Kontrollkultur, ■ . In a wurde ein Katalysator zur Entfernung von Restsauerstoff nach Gekeler (80) verwendet.

Die Abbn. 4 a und 4 b zeigen den Verlauf der Einbaurate asynchroner Zellkulturen aus denen nach 3.1.6. 1 ml-Aliquots entnommen wurden, die nach 3.3.3. markiert wurden. In Abb. 4 a erreicht die Einbaurate durch Wiederbelüftung nach 4 Stunden Anaerobie innerhalb von 2 Stunden fast den Ausgangswert, nach 7 Stunden übertrifft sie ihn. In jedem Fall wird die Einbaurate der Kontrollkultur übertroffen. Aus Abb. 4 b geht deutlich hervor, daß sich die Einbaurate mit der Blockdauer stärker stimulieren läßt.

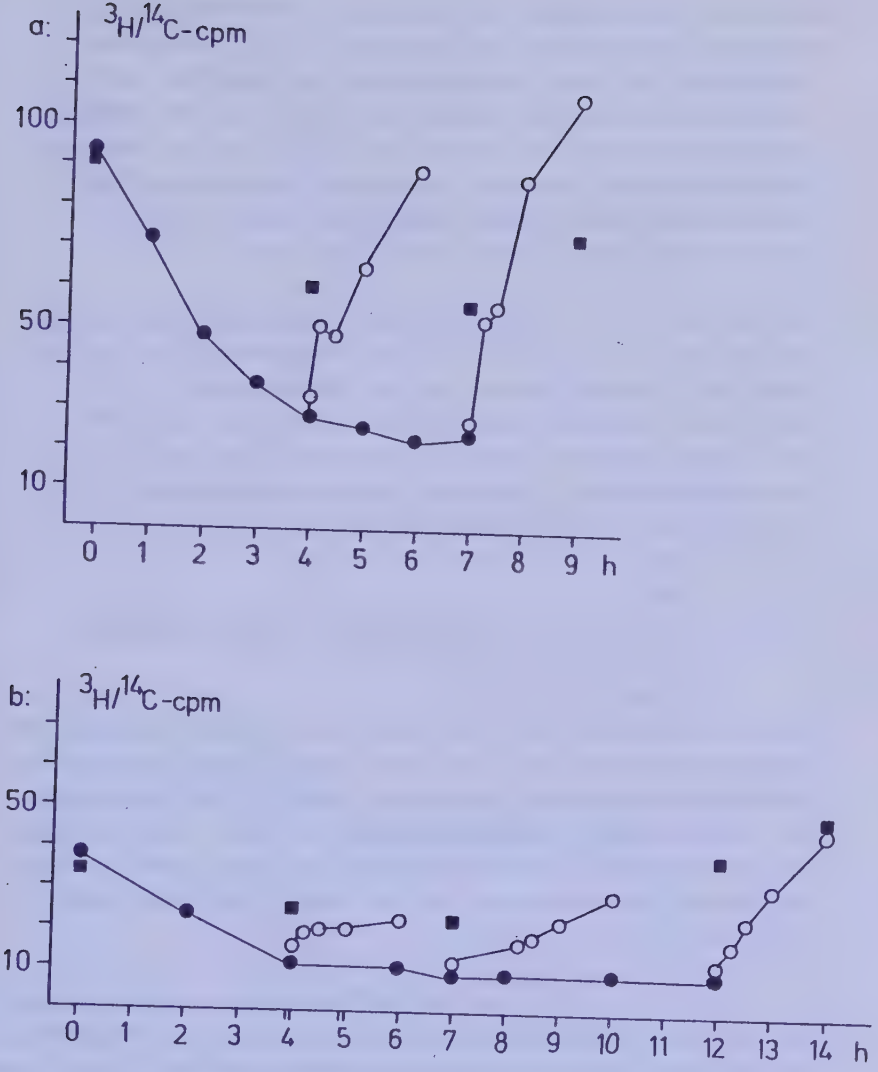


Abb. 4: Vorbehandlung der Zellen wie in Abb. 3 und auch gleiche Bezeichnungen. Die Begasung erfolgte mit Ar/CO_2, enthaltend 0,1 % Sauerstoff, bezogen auf den Partialdruck in Luft.

Obwohl es nicht möglich war, direkt in der Kultur die Sauerstoffkonzentration zu bestimmen, so ist doch wahrscheinlich, daß durch vollständige Anaerobie die Zellen irreversibel geschädigt werden. Durch Messung der Sauerstoffkonzentration über und in der Kultur wäre es möglich, genauere Aussagen über die Sauerstoff-Abhängigkeit der Vorgänge machen zu können. Unwägbarkeiten des experimentellen Aufbaues wären damit ausgeschlossen.

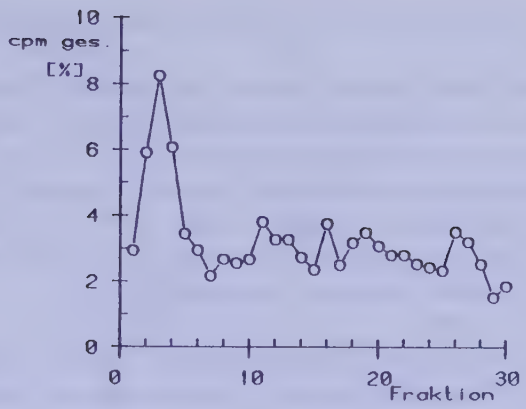
Das von den Ergebnissen von Gekeler abweichende Verhalten könnte seine Ursache auch in einer Veränderung der Zellen haben. Seine Zellen wurden vor den Experimenten in etwa 30 in vitro-Passagen selektioniert. Durch die sich anschließenden Mäusepassagen können sich andere Zelltypen herausselektionieren, da sich die Wachstumsbedingungen in der Maus von denen der in vitro-Kultur unterscheiden.

4.1.1.4. Stimulierung der Initiation der DNA-Synthese durch Desoxycytidin

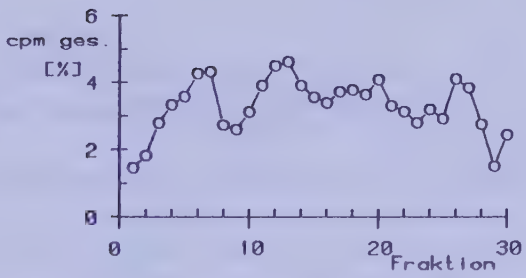
In der Einleitung wurde die Vorstellung von der Kopplung der DNA-Replikation an eine funktionierende Atmungskette und die Aufhebbarkeit des Anaerobieblocks durch 0,1 mM Desoxycytidin erwähnt. Davon ausgehend wurden asynchrone Zellen unter und nach Anaerobie mit Desoxycytidin versetzt, und die Größenverteilung der neusynthetisierten DNA auf dem alkalischen Sucrosegradienten bestimmt.

In der Abb. 5 a - d wurden die Zellen nach 5 Stunden Anaerobie jeweils 10 Minuten markiert. Der Einbau unter Anaerobie ist sehr gering und kann nicht ausgewertet werden. Direkt nach Blockaufhebung markierte Zellen markieren DNA, die sich fast über den ganzen Gradienten verteilt. Dagegen wird bevorzugt DNA von 10 - 15 S markiert, wenn unter Anaerobie gleichzeitig mit der Pulsmarkierung Desoxycytidin zugegeben wird. Durch Vorinkubation der Zellen mit Desoxycytidin vor der Pulsmarkierung erscheint ein weniger bevorzugt markierter, breiter Bereich von 10 - 40 S.

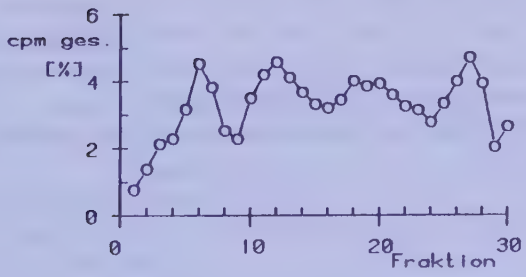
a:


cpm ges.
[%]
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

b:


cpm ges.
[%]
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

c:


cpm ges.
[%]
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

d:

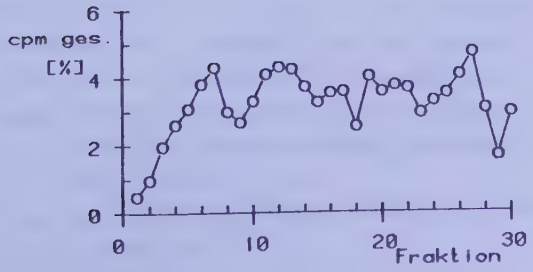

cpm ges.
[%]
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

Abb. 5: Stimulierung der Initiation mit Desoxycytidin

Asynchrone Zellen wurden nach 3.1.3. in Kultur genommen, 5 Stunden anaerobisiert, Aliquots nach 3.1.6. entnommen und folgendermaßen weiterbehandelt:

a: radioaktive Pulsmarkierung gleichzeitig mit Zugabe von Desoxycytidin; $\sum$ cpm = 2964

b: Zugabe von Desoxycytidin, anaerob, für 10 Minuten, dann Pulsmarkierung mit Wiederbelüften; $\sum$ cpm = 4730

c: Pulsmarkierung mit Wiederbelüften; $\sum$ cpm = 17530

d: Pulsmarkierung und Desoxycytidin-Zugabe mit Wiederbelüften; $\sum$ cpm = 23983

c_{dCyt} = 0,1 mM

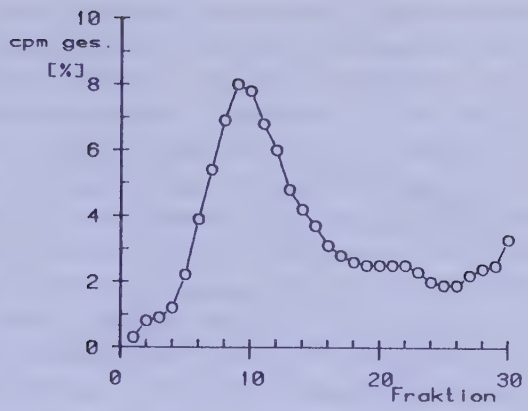
Pulsmarkierung: 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin für 10 Minuten.

Analyse auf dem alkalischen Sucrosegradienten nach 3.8.1. und 3.8.2.

Summe der cpm von 200 000 Zellen auf dem Gradienten.

Nach einer Stunde Vorinkubation mit Desoxycytidin unter Anaerobie (Abb. 6) läßt sich, im Gegensatz zur nicht mit Desoxycytidin behandelten Kultur, eine Fraktion von 40 - 45 S bevorzugt markieren. Demnach können in dieser asynchronen Zellkultur durch Desoxycytidin Neuinitiationen gestartet werden, die synchron wachsen.

a:



b:

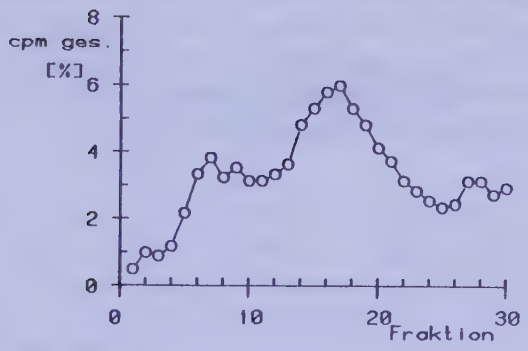


Abb. 6: Stimulierung der Initiation mit Desoxycytidin

Eine asynchrone Zellkultur wurde wie in Abb. 5 angelegt, 6 Stunden anaerobisiert und Aliquots folgendermaßen entnommen und weiterbehandelt:

a: Entnahme von 2 ml nach 3.1.6., 1 Stunde Inkubation mit 0,1 mM Desoxycytidin unter Anaerobie, dann Pulsmarkierung mit 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin für 10 Minuten.

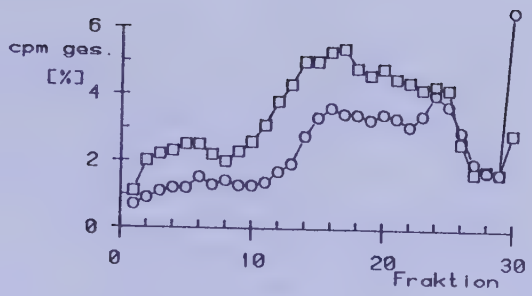
b: Pulsmarkierung mit 50 µCi/ml mit ^{3}H-Thymidin für 10 Minuten unter Anaerobie. Entnahme von 2 ml nach 3.1.6., Analyse auf dem alkalischen Sucrosegradienten nach 3.8.1. und 3.8.2., kurzer Lauf.

Summe der cpm von 400 000 Zellen auf dem Gradienten:

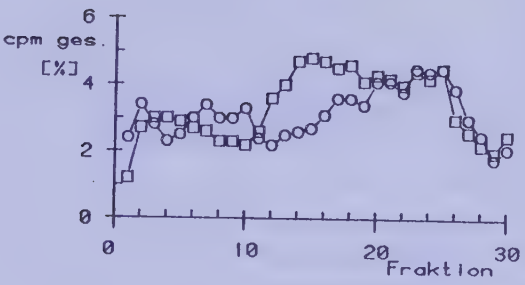
a: 68 133 b: 118 332

Die mit Desoxycytidin inkubierten Kulturen fielen durch ihren durchweg geringeren Einbau an ^{3}H-Thymidin, im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen, auf. In einem Experiment wurden die Zellen insgesamt 6 Stunden anaerob gehalten, davon verschiedene Zeiten mit Desoxycytidin im Medium (Abb. 7 a - c). Die Größenverteilung markierter DNA wurde auf dem alkalischen Sucrosegradienten verfolgt. Die auf den Gradienten aufgetragene Menge an Radioaktivität fiel mit der Einwirkungsdauer von Desoxycytidin deutlich ab. Das Gradientenprofil verschob sich während dieser Zeit in Richtung der Markierung kleinerer DNA-Moleküle. Diese Verschiebung ist nicht sehr deutlich. Es muß aber auch der Zeitpunkt der Desoxycytidin-Zugabe berücksichtigt werden, der von 4 - 5,5 Stunden nach Etablierung des anaeroben Zustandes reichte. Während dieses Zeitraums sind noch Veränderungen im Einbauverhalten und damit auch im Replikationsmuster im Gange.

a:


6
cpm ges.
[%]
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

b:


6
cpm ges.
[%]
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

c:

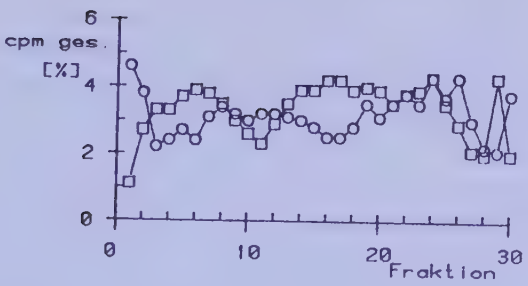

6
cpm ges.
[%]
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

Abb. 7: Alkalische Sucrosegradientenzentrifugation mit Desoxycytidin behandelter, anaerobisierter Zellen; kurzer Lauf.

Asynchrone Zellen wurden nach 3.1.3. in Kultur genommen, 6 Stunden anaerobisiert, 1 ml Aliquots entnommen und mit 20 µCi/ml ^{3}H-Thymidin 10 Minuten pulsmarkiert. 30 (a), 60 (b), 120 (c) Minuten vor der Pulsmarkierung wurden die Proben nach 3.1.7. anaerob entnommen und anaerob zu Desoxycytidin ad 0,1 mM gegeben.

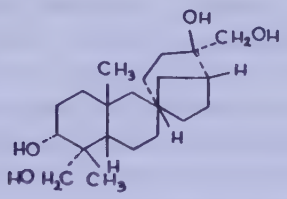
□ Kontrolle ohne Desoxycytidin, ○ mit Desoxycytidin

a:	Σ cpm	15 339 Kontrolle
	Σ cpm	7 333 mit Desoxycytidin
b:	Σ cpm	15 292 Kontrolle
	Σ cpm	3 632 mit Desoxycytidin
c:	Σ cpm	12 817 Kontrolle
	Σ cpm	678 mit Desoxycytidin

4.1.2. Wirkung der Hemmstoffe Methotrexat und Aphidicolin

4.1.2.1. Aphidicolin

Aphidicolin ist ein tetrazyklisches Diterpenoid der folgenden Struktur:



Es ist ein Mykotoxin, das aus dem Pilz Cephalosporium aphidicola und anderen Pilzen gewonnen wird (84, 85).

Durch seine spezifische Hemmung der α-Polymerase ist es eine wertvolle Substanz für viele Fragestellungen. Im Gegensatz zu anderen Hemmstoffen hat es keinen Einfluß auf die Protein- und RNA-Biosynthese und andere Synthesewege, wie die von Nukleotiden und deren Umsetzung (123). Pooleffekte kann man allerdings nicht ausschließen, da Aphidicolin den Pyrophosphataustausch hemmt. Die Ergebnisse bezüglich der Reparaturvorgänge unter Aphidicolineinwirkung sind widersprüchlich (135 - 139). Diese Frage dürfte aber mit der Klärung der Beteiligung der α-Polymerase an der Reparatursynthese in den verschiedenen Systemen beantwortet werden können.

Aphidicolin hat keinen Einfluß auf die Aufnahme von ^{3}H-Thymidin in Seeigelblastulae (140) und auf die Aktivität von DNA-Ligase (18).

Der Hemm-Mechanismus des Aphidicolins kann je nach untersuchtem System ganz unterschiedlich sein. An gereinigter α-Polymerase aus Seeigelblastulae wird die Bindung von Desoxycytidin durch Aphidicolin kompetitiv gehemmt. Die Hem-

mung durch Aphidicolin ist unkompetitiv hinsichtlich der Bindung von DNA und nicht-kompetitiv hinsichtlich der Bindung der anderen Nukleotidtriphosphate an die α-Polymerase (86). Die Empfindlichkeit der α-Polymerase gegenüber Aphidicolin nimmt mit der Reinigung ab. Polymerasen aus Bakterien und ihren Phagen (E. coli, T 4) sind unempfindlich, Polymerasen einiger Tierviren (SV 40, Herpes-, Adenovirus) jedoch hemmbar, Resistenz spiegelt meist eine mutierte α-Polymerase wieder (85, 193).

Durch eine spezifische Wachstumshemmung proliferierender Zellen kann Aphidicolin zur Synchronisation von Zellkulturen verwendet werden (141). Die Vorteile einer solchen Synchronisation sind die Reversibilität, wenn der Hemmstoff innerhalb einer Generationszeit wieder entfernt wird, und die Nicht-Beeinflussung anderer Synthesewege. Durch Synchronisation von Hela-Zellen mit 5 µg/ml Aphidicolin kann man die Zellen in der frühen S-Phase arretieren (98).

Auf der Ebene der Replikationsintermediate sind die Effekte vielfältig und je nach System verschieden. Zum einen werden Intermediate bis zu Replikongröße angereichert und die Reifung inhibiert (89, 140). Zum anderen werden Neuinitiationen und das Verschmelzen kurzer DNA-Stücke unterdrückt, aber die Reifung größerer Replikationsintermediate bleibt unbeeinflußt (88).

Außer den Effekten auf Replikationszwischenstufen sind eine erhöhte Anzahl von Rekombinationen zwischen Schwesterchromatiden an definierten Stellen in Hamsterzellen in der frühen S-Phase (142) und Chromosomenaberrationen an bestimmten Stellen in menschlichen Zellen beobachtet worden (160).

4.1.2.2. Einfluß verschiedener Aphidicolinkonzentrationen auf die DNA-Synthese

Ehe Aphidicolin in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen zur Synchronisation eingesetzt werden konnte, wurde eine Hemmkurve aufgenommen, und das Wiederansteigen der Syntheserate nach Entfernen des Hemmstoffes verfolgt.

Dazu wurden in vivo mit ^{14}C-Thymidin vormarkierte Zellen 3 Stunden in Kultur gehalten. Je 2 ml der Zellkultur wurden dann zu 10 µl Aphidicolin in Äthanol in vorbereitete Inkubationsgefäße gegeben. Nach weiteren 5 und 30 Minuten wurde nach 3.3.3. 10 Minuten pulsmarkiert und die Radioaktivität in der säurefällbaren Fraktion nach 3.12.1. bestimmt. Der ^{3}H-Thymidineinbau wurde auf die ^{14}C-Thymidin-Markierung bezogen (Abb. 8).

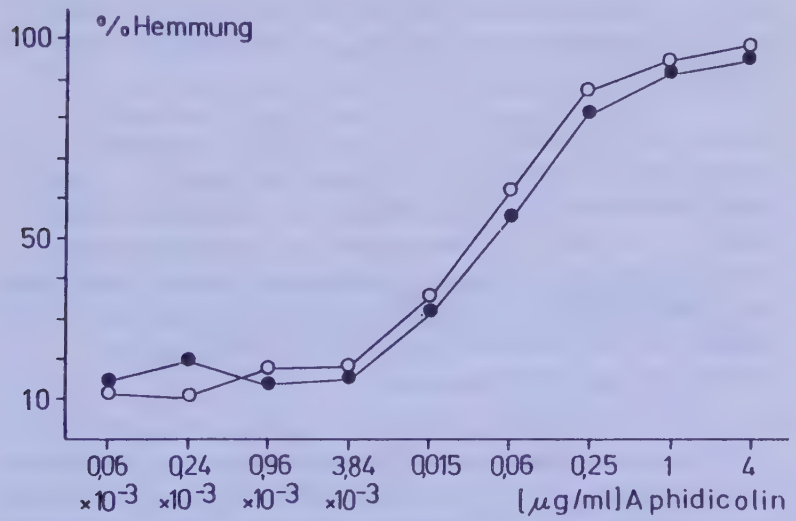


Abb. 8: Abhängigkeit der DNA-Synthese von verschiedenen Aphidicolinkonzentrationen.
In vivo vormarkierte Zellen wurden 3 Stunden in Kultur gehalten, 5 (○) und 30 (●) Minuten mit Aphidicolin versetzt und dann nach 3.3.3. pulsmarkiert.

Die Hemmkurve entsprach etwa den Werten in anderen Systemen (143, 144). Der Einbau in säurefällbares Material wird bei 4 µg/ml Aphidicolin bis zu 96 % gehemmt. Eine vollständige Hemmung kann man, bedingt durch mitochondriale (87) und eventuell auftretende Reparatursynthese, nicht erwarten. Etwa 10 % Hemmung tritt schon bei der geringsten Aphidicolinkonzentration von $0{,}06 \times 10^{-3}$ µg/ml auf. Erstaunlich ist, daß Aphidicolin offenbar sehr schnell an seinen Wirkort gelangt, da sowohl nach 5 als auch nach 30 Minuten Vorinkubation eine nahezu identische Hemmkurve resultiert.

Um die Reversibilität der Hemmung zu prüfen, wurden ebenfalls in vivo mit ^{14}C-Thymidin vormarkierte Zellen 3 Stunden in Kultur genommen und anschließend mit Aphidicolin bei einer Konzentration von 1 µg/ml 5 und 30 Minuten inkubiert. Blockaufhebung erfolgte durch Abzentrifugieren der Zellen und Aufnehmen in frischem Medium. Markiert wurde zu den verschiedenen Zeiten wie bei der Aufnahme der Hemmkurve (Abb. 9).

Sofort nach dem Waschen der Zellen und Wiederaufnahme in frischem Medium beträgt die Hemmung nur noch 50 %. Nach etwa einer Stunde ist die anfängliche Einbaurate wieder erreicht. Die Dauer der Vorinkubation bestimmt aber den weiteren Verlauf. Je länger vorinkubiert wurde, desto langsamer läßt sich die Hemmung aufheben. Ungeklärt blieb das vorübergehende Wiederauftreten einer Einbauhemmung 40 Minuten nach Blockaufhebung.

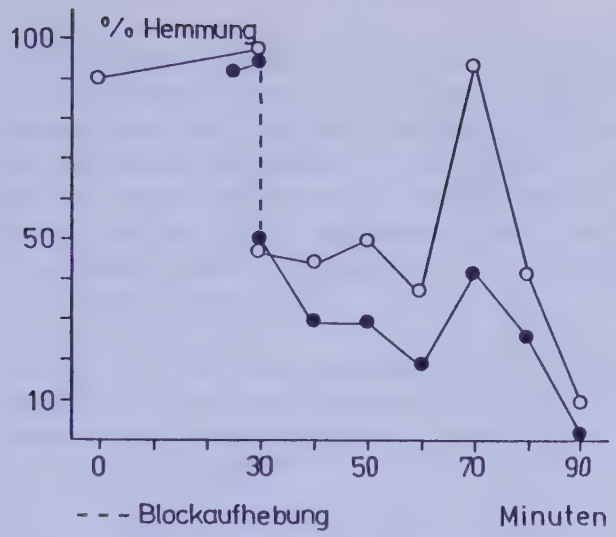
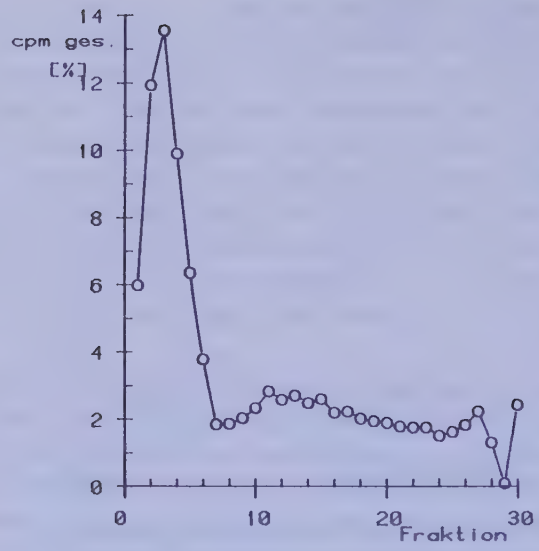


Abb. 9: Reversibilität der Aphidicolinhemmung
Vorbehandlung der Zellen wie in Abb. 8. Sie wurden mit 1 µg/ml Aphidicolin 5 (●) und 30 (○) Minuten inkubiert, dann in frischem Medium aufgenommen und jeweils nach 3.3.3. pulsmarkiert.

4.1.2.3. Einfluß von Aphidicolin auf das Wachstum neusynthetisierter DNA synchroner und asynchroner Zellen

Der Einfluß von Aphidicolin auf das Wachstum und die Größenverteilung neusynthetisierter DNA aus asynchronen Zellen wurde mittels alkalischer Sucrosegradientenzentrifugation untersucht. Dazu wurde eine Zellkultur mit 750 000 Zellen/ml 5 Stunden unter Anaerobie gehalten, um Neuinitiationen zu verhindern. 5 Minuten vor dem Aufheben der Anaerobie wurde Aphidicolin auf 2 µg/ml anaerob zugegeben. Direkt nach dem Aufheben der Anaerobie wurde mit 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin 10 Minuten markiert (Abb. 10 a, b).

a:



b:

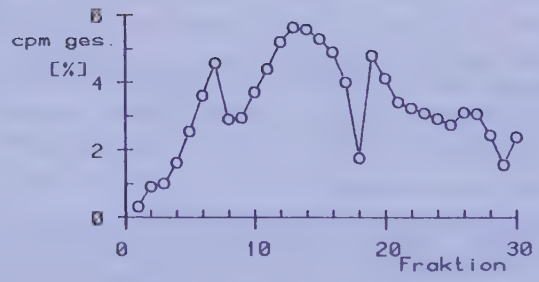


Abb. 10: Alkalische Sucrosegradientenzentrifugation, nach 3.8.1. und 3.8.2., anaerobisierter und mit 1 µg/ml Aphidicolin behandelter Zellen; kurzer Lauf.

Eine in vitro-Kultur (3.1.3.) wurde 5 Stunden anaerobisiert. 5 Minuten vor Wiederbelüften wurde in a mit 2 µg/ml Aphidicolin versetzt. Nach Wiederbelüften wurde sofort mit 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin 10 Minuten pulsmarkiert. Σcpm in a: 9002, in b: 162762 von jeweils 400 000 Zellen.

Die Markierung erfolgt hier vor allem in DNA von 10 - 15 S mit wenig Einbau in höhermolekulare DNA. Im Vergleich dazu verteilt sich markierte DNA ohne Aphidicolin über den ganzen Gradienten. Der Einbau in DNA erfolgt zum großen Teil in noch reifende DNA-Moleküle, während neuinitiierte DNA weniger markiert wird. Im Gegensatz dazu wird unter Aphidicolinblock bevorzugt neusynthetisierte DNA markiert und in ihrem Wachstum gehemmt.

Bei geringerer Aphidicolinkonzentration (0,25 µg/ml) werden zusätzlich zu den Neuinitiationen Moleküle in Replikongröße (etwa 70 - 80 S) markiert (Abb. 11 a, b).

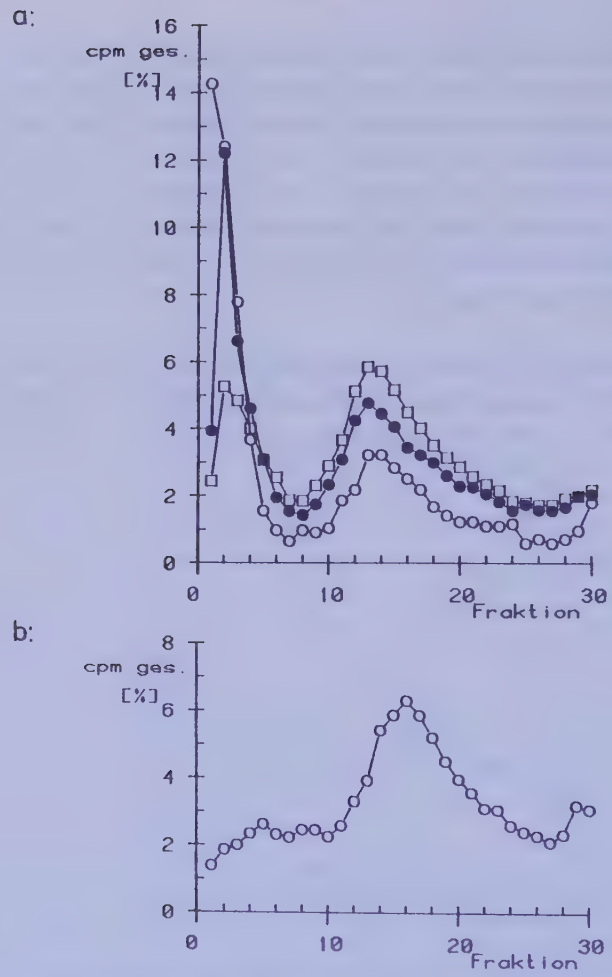


Abb. 11: Alkalische Sucrosegradientenzentrifugation, nach 3.8.1. und 3.8.2., anaerobisierter und mit 0,25 µg/ml Aphidicolin behandelter Zellen, kurzer Lauf.

Vorbehandlung der Zellen wie in Abb. 10. 30 Minuten nach Wiederbelüften wurde a: 1 (○), 4 (●) und 10 (□) Minuten pulsmarkiert; b: 4 Minuten ohne Aphidicolin pulsmarkiert. Markierung: 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin. Σ cpm a: (○) 1558, (●) 8983, (□) 30604 , b: 30041

Nach einem einminütigen Puls sedimentiert kaum Radioaktivität der neusynthetisierten DNA in die Sucrose. Ab 4 Minuten Markierungsdauer wird vor allem DNA von 5 - 10 S markiert, die langsam wächst. Nach Aufheben des Aphidicolinblocks reift die DNA so wie in vorher nicht gehemmten Zellen (Abb. 12 a, b).

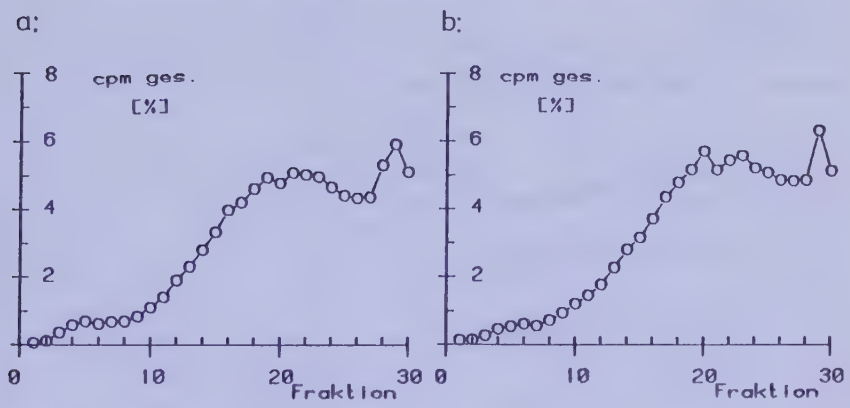


Abb. 12: Alkalische Sucrosegradientenzentrifugation nach Puls-Chase-Markierung der Zellen nach 3.3.7.; Zellkultur der Abb. 11; kurzer Lauf; Chase-Dauer: 2 Stunden

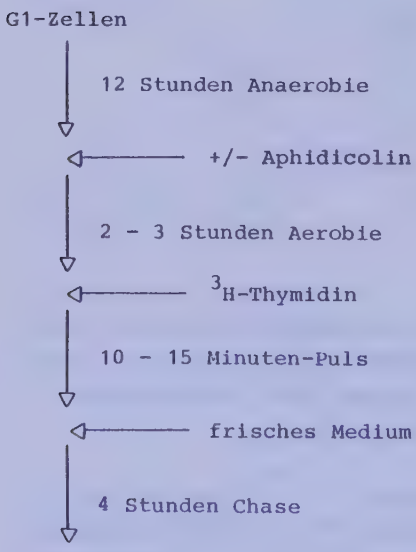
Pulse: 11 a: 10 Minuten Σ cpm 346 334
11 b: 4 Minuten Σ cpm 326 919

---

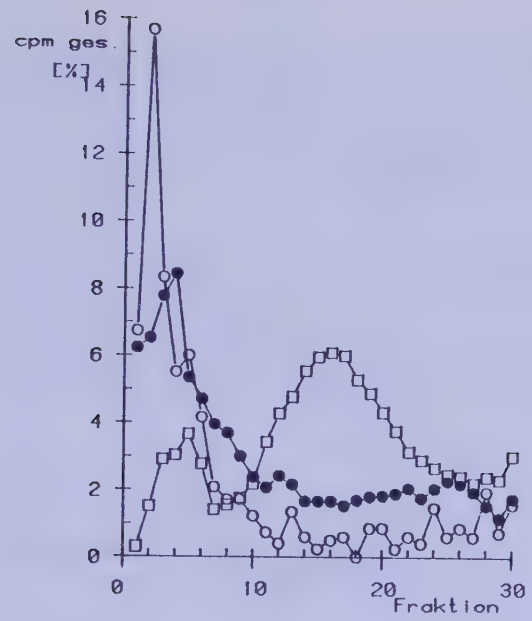
14 Stunden anaerob kultivierte G1-Zellen wurden, mit und ohne Vorinkubation mit 0,25 µg/ml Aphidicolin, aerobisiert und 10 Minuten mit 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin 10 Minuten pulsmarkiert, und die Größenverteilung danach und nach einem zweistündigen Chase bestimmt (Abb. 13 a, b). Nur während der ersten Minute findet man eine Anreicherung von Molekülen bei etwa 10 S. Ansonsten gleichen sich die Gradientenprofile der DNA gehemmter und nicht-gehemmter Zellen.

Unterschiede ergeben sich, wenn geblockte Zellen längere Zeit nach dem Wiederbelüften pulsmarkiert werden (Abb. 13 c). Mit Aphidicolin behandelte Zellen reichern Moleküle bis Replikongröße an, deren Reifung im Vergleich zur Kontrollkultur nur in geringem Ausmaß stattfindet. 3 Stunden mit Aphidicolin (0,25 µg/ml) gehemmte Zellen werden in ihrem DNA-Wachstum nicht irreversibel geschädigt (Abb. 13 d, e). Die radioaktiv markierte DNA reift während 4 Stunden nach Blockaufhebung vollständig.

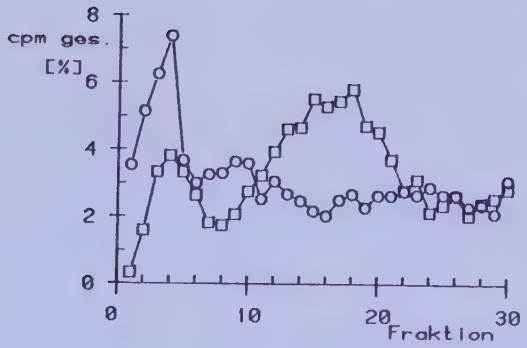
Versuchsschema der Abb. 13 c - e:



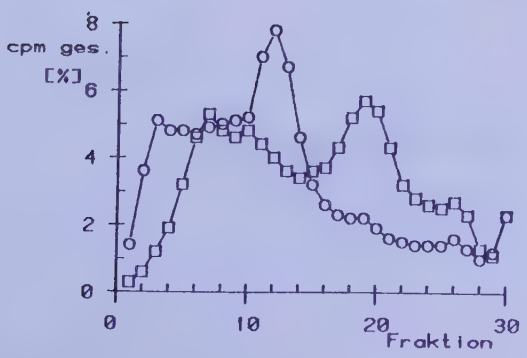
a:


cpm ges.
[%]
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

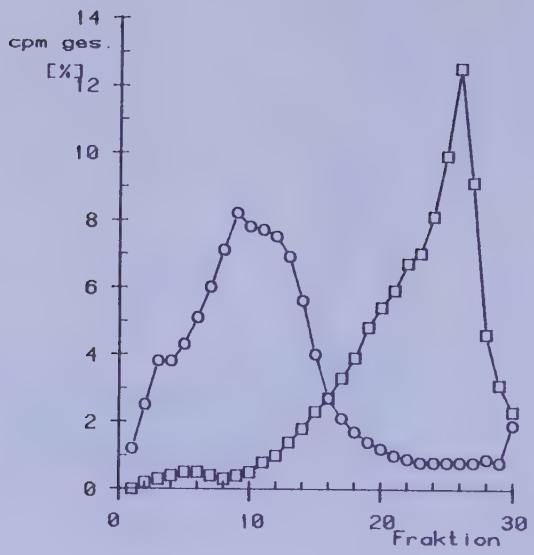
b:


cpm ges.
[%]
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

c:


cpm ges.
[%]
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

d:


cpm ges.
[%]
14
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

e:

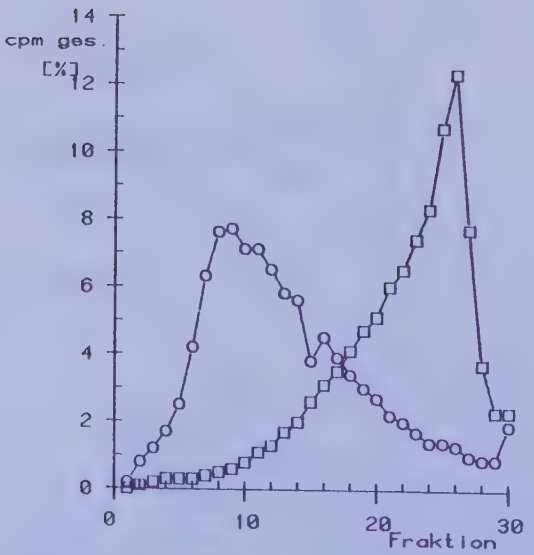

cpm ges.
[%]
14
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

Abb. 13: Alkalische Sucrosegradientenzentrifugation selektionierter G1-Zellen, nach 3.2.1. 14 Stunden anaerobisiert, markiert mit 50 µCi/ml ^{3}H-Thymidin nach Wiederbelüften; mit und ohne Aphidicolin (0,25 µg/ml) kurzer Lauf.

a: Aphidicolinzugabe 5 Minuten vor Wiederbelüftung

- ○ 1 Minuten-Puls ∑cpm 1 016
- ● 10 Minuten-Puls ∑cpm 4 200
- □ 10 Minuten-Puls, 2 Stunden Chase (3.3.7.) ohne Aphidicolin ∑ cpm 50 162

b: ohne Aphidicolin

- ○ 1 Minuten-Puls ∑cpm 5 268
- □ 10 Minuten-Puls, 2 Stunden Chase (3.3.7.) ∑ cpm 54 443

c: 12 Stunden Anaerobie, 2 Stunden Aerobie mit und ohne 0,25 µg/ml Aphidicolin, dann 10 Minuten Pulsmarkierung.

- ○ mit Aphidicolin ∑ cpm 8 147 120 000 Zellen
- □ ohne Aphidicolin ∑ cpm 49 849 200 000 Zellen

d: 12 Stunden Anaerobie, 3 Stunden Aerobie mit 0,25 µg/ml Aphidicolin, dann 15 Minuten Pulsmarkierung und anschliessender Chase für 4 Stunden.

- ○ Puls ∑ cpm = 30 083 $\bar{M}_W$ = 65,3 x 10^6 D
- □ Puls-Chase ∑ cpm = 52 023 $\bar{M}_W$ = 253,4 x 10^6 D

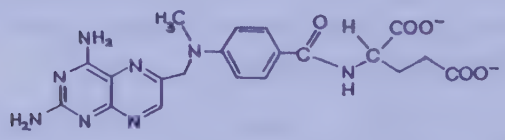
e: wie 13 d, ohne Aphidicolin

- ○ Puls ∑ cpm = 310 430, 250 000 Zellen, $\bar{M}_W$ = 95 x 10^6 D
- □ Puls-Chase ∑ cpm = 217 225, 160 000 Zellen, $\bar{M}_W$ = 237 x 10^6 D

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Effekte von Aphidicolin auf Replikationszwischenstufen von der Konzentration und der Vorbehandlung der Zellen abhängig sind. Neuinitiierte Replikons asynchroner Zellen lassen sich auch schon durch geringe Konzentrationen an Aphidicolin (0,25 µg/ml) in ihrem Wachstum stark hemmen und akkumulieren DNA-Moleküle zwischen 5 und 10 S. Bei hohen Aphidicolinkonzentrationen (1 µg/ml) wird der Einbau von ^{3}H-Thymidin in höhermolekulare DNA ab etwa Replikongröße (70-80 S) stark unterdrückt. Initiierte Replikons am Anfang der S-Phase werden durch Aphidicolin erst beeinflußt, wenn sie Replikongröße (70-80 S) erreichen. Die Reifung der DNA unterscheidet sich nach Blockaufhebung nicht von der DNA aus den Zellen, die ohne Aphidicolin in gleicher Weise vorbehandelt wurde.

Die Effekte verschiedener Aphidicolinkonzentrationen auf Replikationsintermediate sind auch bei Kozu et al. (89) beschrieben.

4.1.2.4. Methotrexat (Amethopterin)



Methotrexat ist ein Hemmstoff der Dihydrofolatreduktase und Thymidilatsynthetase und damit der Thymidin- und Purinbiosynthese. Seine Zytotoxizität wird auf seine Hemmung der DNA-Synthese durch Mangel an Nukleotiden zurückgeführt, da ruhende Zellen nicht Methotrexat-sensitiv sind. So akkumulieren proliferierende Ehrlich-Aszites-Tumorzellen unter 2 µM Methotrexat während den ersten 10 Stunden zunehmend

Strangbrüche, die nach Zugabe von Thymidin, Hypoxanthin und nicht-essentiellen Aminosäuren nicht repariert werden. In nicht proliferierenden Zellen ist der Anteil an aus Strangbrüchen resultierenden kurzen DNA-Molekülen < 5 % (145). In am Anfang der S-Phase synchronisierten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen wird nach Aufheben des Methotrexatblocks in der ersten Minute ein erheblicher Anteil des angebotenen Thymidins in parentale DNA wie bei Exzisionsreparatur eingebaut (82). In einer Konzentration von 1 µM erniedrigt Methotrexat die Syntheseserate in menschlichen Lymphoblasten in den ersten 60 Minuten um 80 %, läßt aber restliche DNA-Synthese noch bis 7 Stunden zu. Es handelt sich dabei zu etwa 90 % um nukleäre DNA-Synthese. Die Pools von dCTP, dCMP und dUMP sind erhöht, wohingegen der Thymidinpool erniedrigt ist. Unter Block akkumuliert DNA von etwa 80 S, die erst nach Blockaufhebung durch dTTP reifen kann (83). Durch das Methotrexat-Analogon Metoprin akkumulieren in menschlichen Lymphoblastoid-Zellen niedermolekulare DNA-Moleküle, die höchstens 4 S groß sind. Sie könnten durch teilweisen Abbau neusynthetisierter DNA als Folge von dUMP-Misinkorporation entstanden sein (146). Gekeler (81) beobachtete die Akkumulierung von DNA im Bereich von 25 S in selektionierten G1-Zellen nach 8 - 12 Stunden Blockdauer. Der Verlauf der S-Phase ist aber unter diesen Bedingungen nach Blockaufhebung nicht gestört, Ehrlich-Aszites-Tumorzellen durchlaufen sie in guter Synchronität (79).

Aufgrund der verschiedenen Ergebnisse schien es einerseits lohnend, Methotrexat zur weiteren Synchronisation und Anreicherung synchroner Replikationseinheiten zu verwenden, andererseits mußte gefragt werden, welche weiteren Einflüsse es auf den Verlauf der DNA-Synthese ausübt. Ausgehend von selektionierten G1-Zellen wurde deren Verhalten unter Methotrexatblock untersucht, und es wurde versucht, die Bedingungen für die Anreicherung synchroner Replikationseinheiten zu finden. Als weiterer Hemmstoff wurde Aphidicolin (4.1.2.1.) verwendet, das initiierende Replikons an der Elongation hemmen sollte.

4.1.2.5. Reversible Blockierung synchroner Zellen an der G1/S-Phasengrenze mit Hemmstoffen

Um die Effektivität eines Blocks durch Hemmstoffe und das Wiederanspringen der DNA-Synthese zu überprüfen, wurden selektionierte G1-Zellen im Verlauf des Methotrexat- und Aphidicolinblocks und nach Blockaufhebung nach 3.3.3. pulsmarkiert (Abbn. 14, 15). Unter Methotrexatblock nahm die Synthese mit der Zeit ab und gegen Ende des Aphidicolinblocks etwas zu. Die genaueren Verhältnisse werden in 4.1.2.7. beschrieben. In jeder Kultur stieg die Syntheserate sofort nach Blockaufhebung stark an, im Fall der mit Methotrexat geblockten Kultur etwa dreimal mehr als in der mit Aphidicolin geblockten. Sie zeigt in beiden Kulturen nach 30 - 60 Minuten nochmal einen Abfall, der auch nach Aufheben anaerober Kulturen beobachtet werden kann (80). Effekte des Pools an Vorläufern und Bausteinen der DNA-Synthese kann man vermuten. Sie wurden aber nicht geklärt. Die Syntheserate 2 Stunden nach Aufheben des Methotrexatblocks stieg auf das Fünffache der parallel markierten, asynchronen Kontrollkultur ohne Hemmstoffe an, nach Aufheben des Aphidicolinblocks nur auf das Doppelte. Die Zellen scheinen demnach nach Methotrexatblock schneller in die S-Phase einzutreten. Werden die Zellen mit Methotrexat und Aphidicolin gleichzeitig blockiert (Abb. 16), erfolgt der Wiederanstieg langsamer.

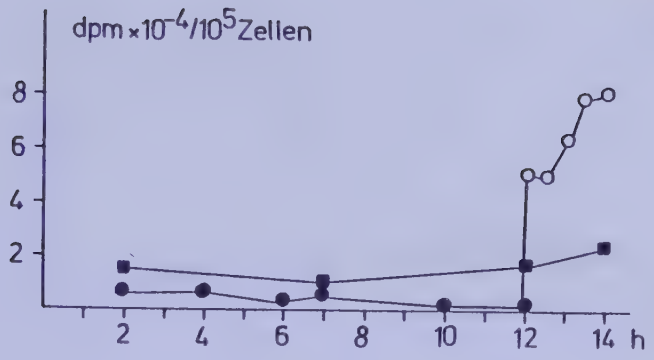


Abb. 14: Reversible Blockierung synchroner Zellen vor dem Eintritt in die S-Phase mit Methotrexat ($c = 10^{-6}$M).

Nach 3.2.1. selektionierte G1-Zellen wurden 12 Stunden nach 3.2.3. mit Methotrexat blockiert und dann aufgehoben. Pulsmarkierung erfolgte nach 3.3.5.

- ● Einbau unter Block
- ○ Einbau nach Blockaufhebung
- ■ Einbau der asynchronen Kontrollkultur

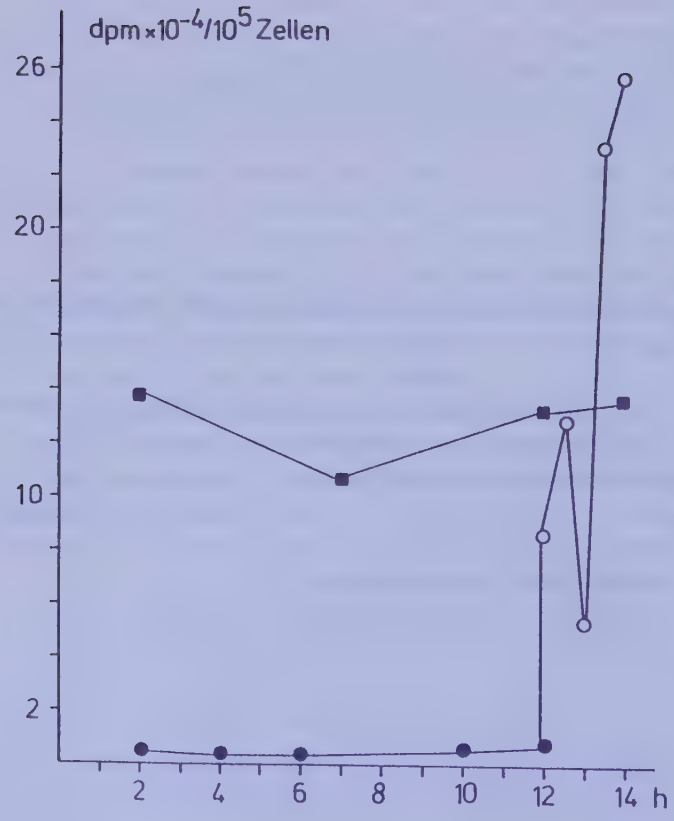


Abb. 15: wie Abb. 14, Blockierung mit Aphidicolin (1 µg/ml)

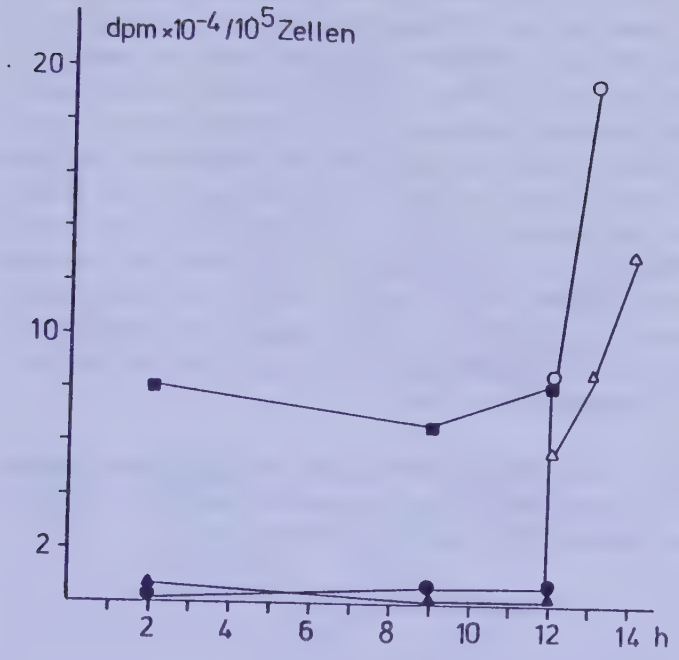


Abb. 16: wie Abb. 14, Blockierung mit Aphidicolin (● Einbau unter Block, O Einbau nach Blockaufhebung) und Methotrexat und Aphidicolin (▲ Einbau unter Block, △ Einbau nach Blockaufhebung).
$c_{MTX} = 10^{-6}M$, $c_{Aphidicolin} = 1$ µg/ml

4.1.2.6. Größenverteilung der neusynthetisierten DNA unter Einwirkung von Hemmstoffen

Die Größenverteilungen der neusynthetisierten DNA zeigen die Abbn. 17 a - 19 a. Unter Methotrexatblock werden mit der Zeit immer kürzere Stücke markiert, wodurch sich der Gipfel des Radioaktivitätsprofils und das $\bar{M}_w$ zu immer kleineren Werten verschiebt. Nach 12 Stunden Methotrexatblock ist Radioaktivität nur noch im Bereich um 15 S feststellbar. Aphidicolin dagegen läßt ein begrenztes DNA-Wachstum zu, weshalb sich auch die Gradientenprofile mit der Blockdauer zu höheren S-Werten hin verbreitern. Unter Block durch Methotrexat und Aphidicolin zu gleicher Zeit akkumuliert DNA um etwa 20 S. Dieses Bild entspricht den Einbaudaten insofern, als daß unter Methotrexat die Einbaurate abnimmt und unter Aphidicolin kontinuierlich mehr Radioaktivität eingebaut wird (Abb. 20).

Die gesamte unter diesen Bedingungen markierte DNA wächst innerhalb von 4 Stunden nach Blockaufhebung auf mindestens Replikongröße ab (70S) (Abbn. 17 b, 18 b, 19 b).

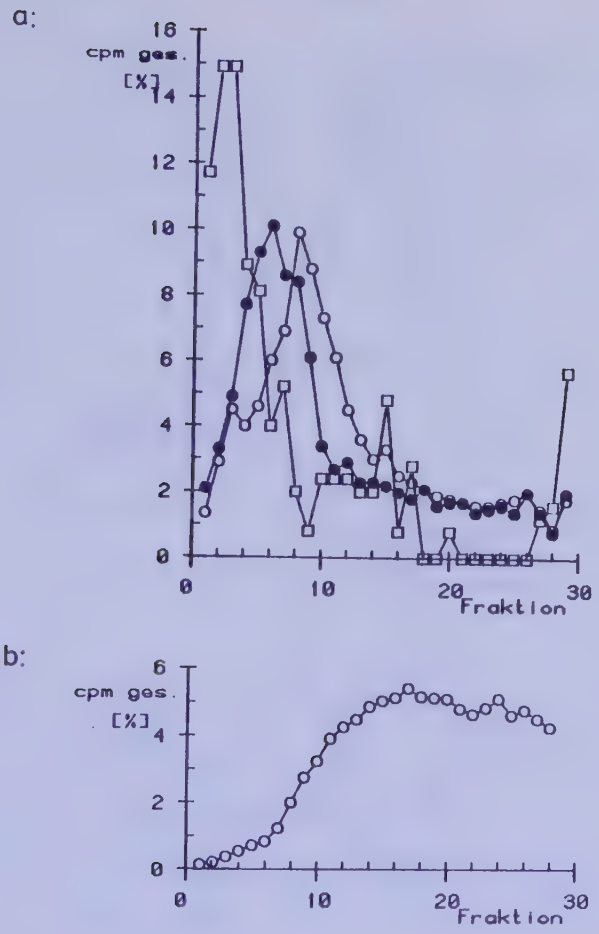
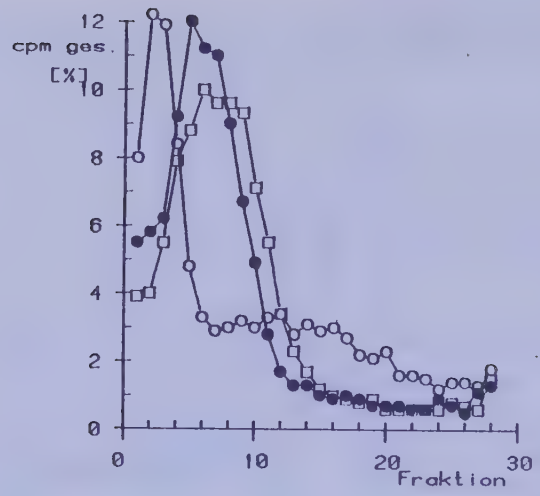


Abb. 17: Größenverteilung und Reifung nach Blockaufhebung von neusynthetisierter DNA auf dem alkalischen Sucrosegradienten synchronisierter G1-Zellen nach verschiedenen Zeiten unter Methotrexat-Block ($c = 10^{-6}$ M); kurzer Lauf. Synchronisation nach 3.2.1., Methotrexatblock nach 3.2.3., Pulsmarkierung nach 3.3.5. für 10 Minuten.

a: nach 2 Stunden Σ cpm 4 172 (○)
nach 8 Stunden Σ cpm 3 840 (●)
nach 12 Stunden Σ cpm 248 (□)

b: Puls nach 12 Stunden, 4 Stunden Chase nach Blockaufhebung Σ cpm 6 870

a:



b:

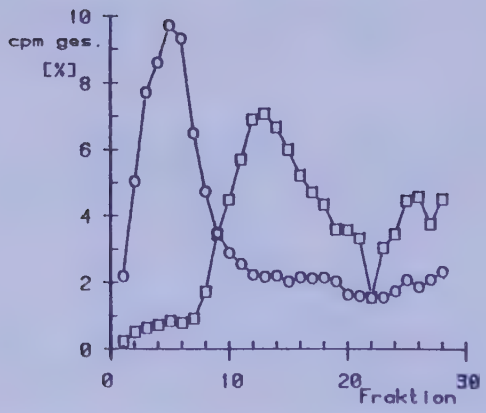
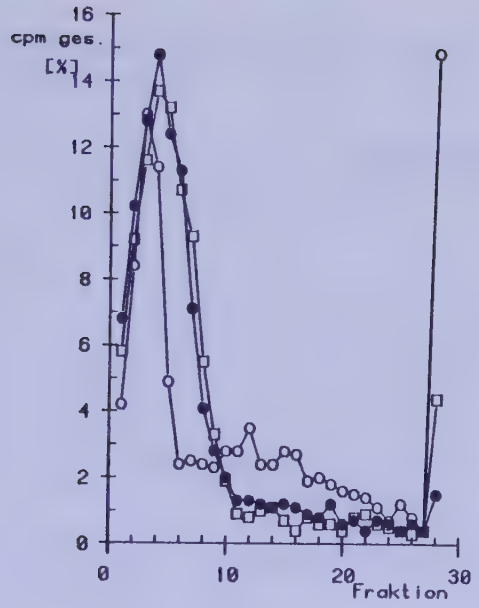


Abb. 18: Wie Abb. 17, aber Aphidicolinblock (1 µg/ml)

a: nach 1,5 Stunden Σ cpm 8 953 (○)
nach 9 Stunden Σ cpm 13 037 (●)
nach 12 Stunden Σ cpm 11 137 (□)

b: Puls nach 11 Stunden, 4 Stunden Chase nach Blockaufhebung Σ cpm 13 599 (○)
Σ cpm 42 583 (□)

a:



b:

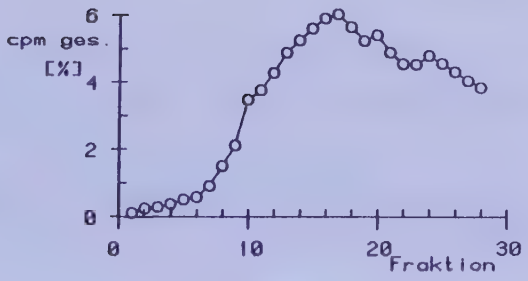


Abb. 19: Wie Abb. 17, aber Methotrexat- und Aphidicolinblock ($c = 10^{-6}$ M und 1 µg/ml)

a: nach 1,5 Stunden Σ cpm 2 073 (○)
nach 9 Stunden Σ cpm 2 358 (●)
nach 12 Stunden Σ cpm 1 556 (□)

b: Pulsmarkierung nach 11 Stunden, 4 Stunden Chase nach Blockaufhebung Σ cpm 1 615

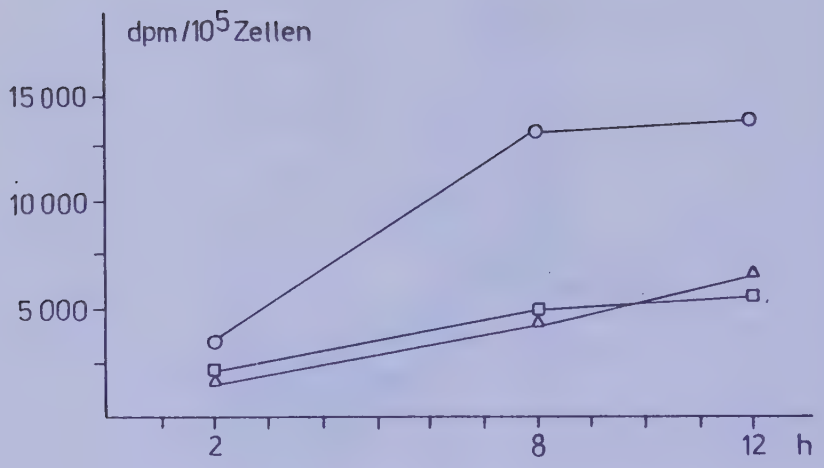


Abb. 20: Einbau in säurefällbares Material selektionierter G1-Zellen unter Methotrexat (10^{-6} M) und/oder Aphidicolin (1 µg/ml), Selektion nach 3.2.1., Blockierung nach 3.2.3., Einbau nach 3.3.6. (Dauermarkierung).

- ○ Methotrexat
- △ Aphidicolin
- □ Methotrexat und Aphidicolin

4.1.2.7. DNA-Synthese synchroner Zellen unter Einwirkung von Hemmstoffen

Um die Vorgänge unter Methotrexat- und/oder Aphidicolinblock genauer zu untersuchen, wurde der Einbau in säurefällbares Material im Verlauf des Blocks verfolgt.

Selektionierte G1-Zellen wurden in Kulturmedium in einer Zelldichte von 400 000 Zellen/ml eingesät und auf drei Kulturflaschen aufgeteilt, die folgende Hemmstoffe und radioaktiv markierte Nukleoside enthielten:

1: Methotrexat für 1 µM Endkonzentration (3.2.3.)
^{3}H-Desoxycytidin für 1,6 µCi/ml Endkonzentration

2: Methotrexat für 1 µM und Aphidicolin für 1 µg/ml Endkonzentration (3.2.3.)
^{3}H-Desoxycytidin für 1,6 µCi/ml Endkonzentration

3: Aphidicolin für 1,4 µg/ml Endkonzentration
^{3}H-Thymidin für 1,7 µCi/ml und Thymidin für 2,5 x 10^{-6} M Endkonzentration

Ein vierte Kultur wurde aus Zellen des Ausgangsmaterials für die Selektion der G1-Zellen angelegt. Sie enthielt 1,7 µCi/ml ^{3}H-Thymidin und 2,5 x 10^{-6} M Thymidin. Nach 2, 8 und 12 Stunden wurden Aliquots aus jeder Kultur entnommen, und jeweils aus 1 ml Zellkultur sowohl der Einbau in säurefällbares Material (3.12.1.) bestimmt, als auch die Größenverteilung der neusynthetisierten DNA im alkalischen Sucrosegradienten analysiert (4.1.2.8.).

Die Zellen der mit Methotrexat geblockten Kultur zeigen ab 8 Stunden Blockdauer einen Abfall der Einbaurate, bauen aber im Vergleich zu der mit Methotrexat und Aphidicolin gleichzeitig behandelten Kultur mehr Radioaktivität ein. Die mit Methotrexat und Aphidicolin geblockte Kultur ändert ihre

Einbaurate nicht, die mit Aphidicolin geblockte Kultur ändert sie nur sehr leicht. Das Ausmaß an Einbau der mit Aphidicolin geblockten Kultur kann man mit dem der beiden anderen Kulturen aufgrund anderer Markierungsbedingungen nicht vergleichen. Man kann aber das Ergebnis so interpretieren, daß bedingt durch den Mangel an Thymidin, unter Methotrexatblock die DNA-Synthese irgendwie aufhört. Ob sie an zufälligen Stellen auf der DNA beziehungsweise im Replikationsprogramm, an Haltepunkten, (147, 194) aufhört oder nicht, kann daraus nicht entnommen werden. Möglich wäre die Interpretation, daß durch die geringe Einbaurate unter Methotrexat- und Aphidicolinblock die Thymidinvorräte langsamer aufgebraucht werden, so daß bis zu zwölf Stunden unter Block noch genügend Thymidin vorhanden ist, wohingegen unter Methotrexat, das ja alleine die Kettenverlängerung nicht hemmt, die Vorräte schneller aufgebraucht werden.

4.1.2.8. Größenverteilung und Reifung der neusynthetisierten DNA synchroner Zellen unter Einwirkung von Hemmstoffen

Um zu sehen, ob die in 4.1.2.7. gemessene Radioaktivität den Einbau in neusynthetisierte DNA wiederspiegelt, wurde ihre Größe im alkalischen Sucrosegradienten bestimmt.

Unter Aphidicolinblock erreicht die markierte DNA einen S-Wert von 35 nach 8 Stunden und von 45 nach 12 Stunden (Abb. 21 b). Unter Methotrexat- und Aphidicolinblock befindet sich der Gipfel nach 8 Stunden bei 25 S (Abb. 21 c). In beiden Fällen wird während der gesamten Blockdauer kein größerer Anteil an Radioaktivität in längere DNA-Moleküle eingebaut. Im Vergleich dazu befindet sich in nur 2 Stunden markierten Zellen einer asynchronen Kultur ein Großteil der Radioaktivität in DNA von Replikongröße (70 - 80 S) und gereifter DNA ab (120 S) (Abb. 21 d).

Unter Methotrexatblock wird zusätzlich eine Population von Molekülen markiert, die etwa die Größe kleiner Replikons (70 S) erreicht (Abb. 21 a) und während der Markierungszeit noch etwas wächst. Parallel dazu erhöht sich der Anteil gereifter DNA. Die Entstehung dieser Moleküle kann erklärt werden durch

- einen Anteil früher S-Zellen, bedingt durch die Selektionsmethode (79), die sich anders verhalten als G1-Zellen,

- die Fähigkeit der Zellen, oder eines Teils der Zellen, in der frühen Phase des Blocks diese DNA zu synthetisieren. Mit der Blockdauer würde diese Fähigkeit abnehmen, so daß man durch einen Puls nach 8 - 12 Stunden bevorzugt kurze DNA-Moleküle markieren könnte, obwohl längere Replikationsintermediate vorhanden sind.

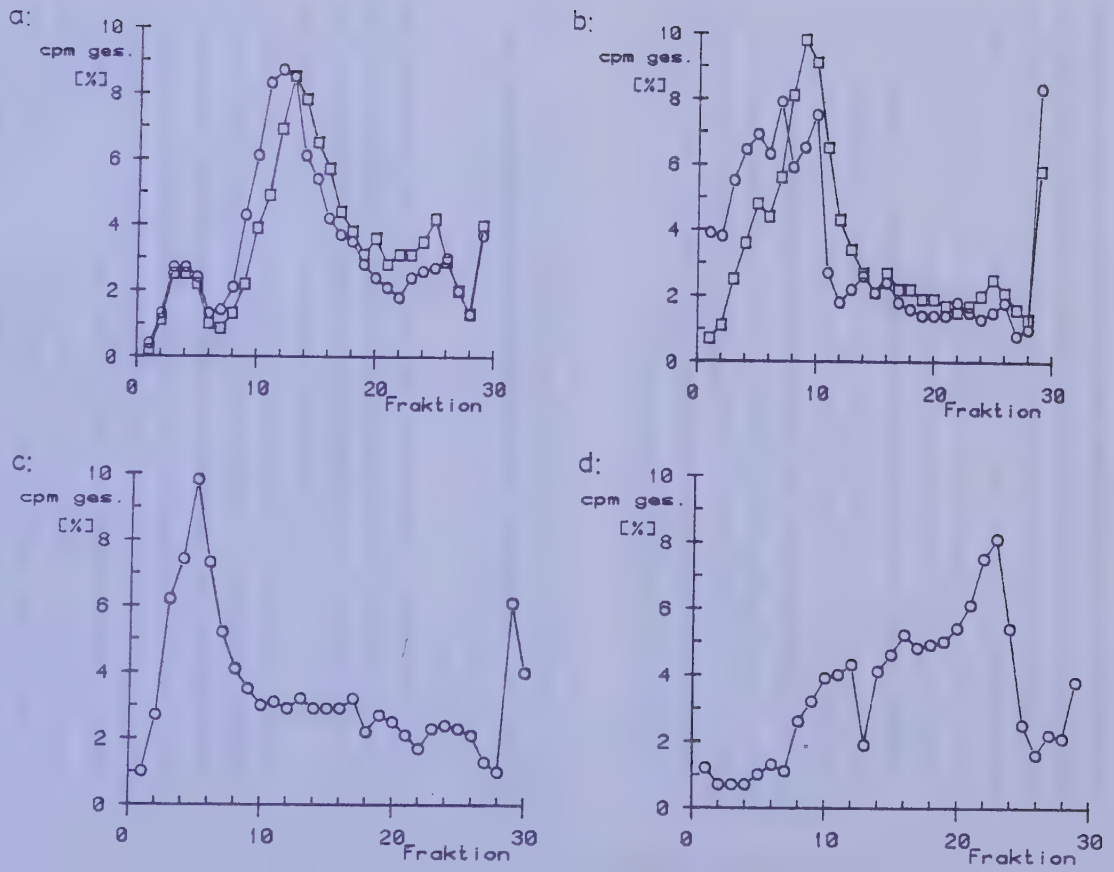
Abb. 21: Größenverteilung der synthetisierten DNA auf dem alkalischen Sucrosegradienten der Abb. 20; kurzer Lauf.

a: Methotrexat 8 Stunden Blockdauer Σ cpm 5 211 (○)
12 Stunden Blockdauer Σ cpm 5 518 (□)

b: Aphidicolin 8 Stunden Blockdauer Σ cpm 2 329 (○)
12 Stunden Blockdauer Σ cpm 2 706 (□)

c: Methotrexat und Aphidicolin 8 Stunden Blockdauer Σ cpm 2 308

d: alkalischer Sucrosegradient einer asynchronen Kultur, die zwei Stunden nach 3.3.6. mit 1,7 µCi/ml ^{3}H-Thymidin- und 2 x 10^{-6} M Thymidin im Medium dauermarkiert worden war. Σ cpm 14 492


a:
cpm ges.
[%]
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion
b:
cpm ges.
[%]
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion
c:
cpm ges.
[%]
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion
d:
cpm ges.
[%]
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

In diesem Zusammenhang ist der Zeitpunkt des Auftretens dieser Fraktion und die Größenverteilung der DNA im Verlauf des Blocks von Interesse. Man kann erwarten, daß in der Kultur eventuell vorhandene frühe S-Zellen analog 4.1.2.6. mit der Zeit in kürzere DNA-Moleküle einbauen. Es müßte sich deshalb mit der Zeit eine Verschiebung der realtiven Anteile der beiden Fraktionen des Gradienten zu kleineren Molekülen ergeben.

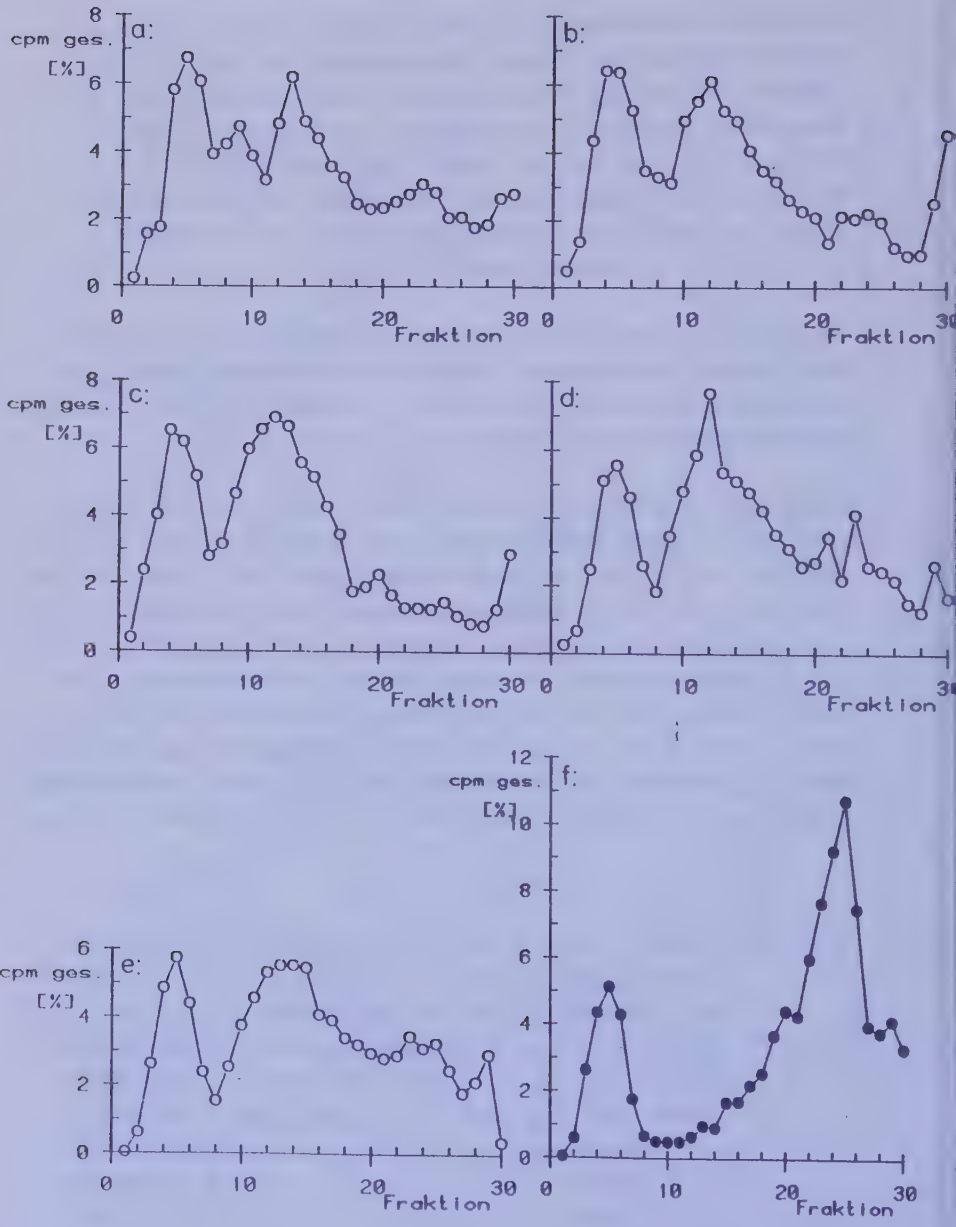
Um dies zu prüfen, wurden selektionierte G1-Zellen verschiedene Zeiten nach Einsaat, unter Methotrexatblock mit gleichzeitiger radioaktiver Markierung, entnommen und im alkalischen Sucrosegradienten analysiert (Abb. 22 a - f).

Schon ab 4 Stunden nach Einsaat wird DNA in Replikongröße (70 - 80 S) neben DNA in Fraktion 5 markiert, deren relative Anteile sich im Verlauf des Blocks ändern. Man findet im zweiten Gipfel bis zu 10 Stunden zunehmend mehr radioaktive Wirkung. Da während des Methotrexatblocks nur unwesentliche Mengen an Radioaktivität eingebaut werden, bedeutet dies, daß die am Anfang des Methotrexatblocks markierbare DNA langsam wächst, und in ihr keine initiierenden Replikons angereichert werden. Betrachtet man den anschließenden Chase nach Blockaufhebung nach 12 Stunden (Abb. 22 f), zeigt sich, daß 88 % der

---

Abb. 22: Größenverteilung der im Verlauf des Methotrexat-Blocks selektionierter G1-Zellen markierbaren DNA auf dem alkalischen Sucrosegradienten; kurzer Lauf; Reifung nach Blockaufhebung, Zonalzentrifugatuion nach 3.2.1., Methotrexat-Block nach 3.2.3., Dauermarkierung nach 3.3.6.. Zeit unter Block

a: 4 Stunden Σ cpm 6 226
b: 6 Stunden Σ cpm 6 549
c: 8 Stunden Σ cpm 7 904
d: 10 Stunden Σ cpm 5 095
e: 12 Stunden Σ cpm 6 870
f: 12 Stunden, 2,5 Std. Chase (3.3.7.) Σ cpm 7 005


a:
b:
c:
d:
e:
f:
cpm ges.
[%]
Fraktion
0
10
20
30
2
4
6
8
12

Radioaktivität im ersten Gipfel während 2,5 Stunden nicht reift. Es ergibt sich somit ein Bild verschiedener Populationen von DNA-Molekülen: ein Anteil der unter den experimentellen Bedingungen nicht wächst, und der in Fraktion 5 des Gradienten während des Blocks akkumuliert; ein anderer Teil befindet sich in Gradientenmitte, hat die Länge von Replikons (70 - 80 S) und wächst langsam. Ein kleiner Teil besteht aus neusynthetisierter DNA, die langsam wächst und nach Blockaufhebung reift. Durch 11 Stunden Block mit Aphidicolin bleibt nach einem vierstündigen Chase ebenfalls 55 % der Radioaktivität unverändert bei Fraktion 5 des Gradienten (Abb. 23).

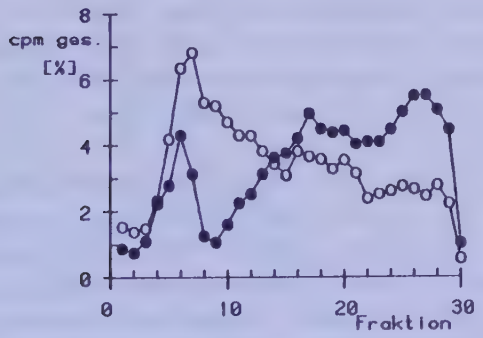


Abb. 23: Größenverteilung und Reifung nach Blockaufhebung neusynthetisierter DNA im Verlauf eines Aphidicolinblocks (1 µg/ml) selektionierter G1-Zellen. Vgl. Abb. 22;

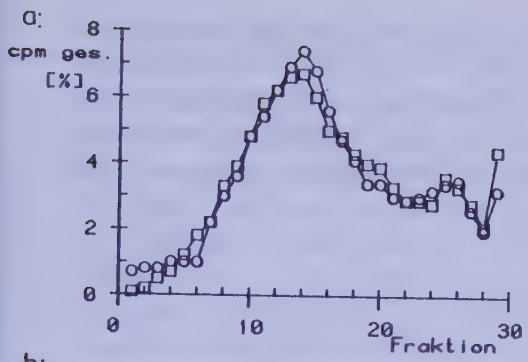
○ 11 Stunden Dauermarkierung Σ cpm 6 047

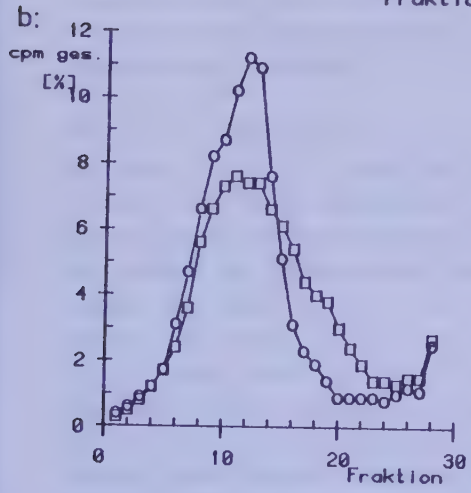
● 11 Stunden Dauermarkierung, 4 Stunden Chase (3.3.7.) nach Blockaufhebung Σ cpm 8 682

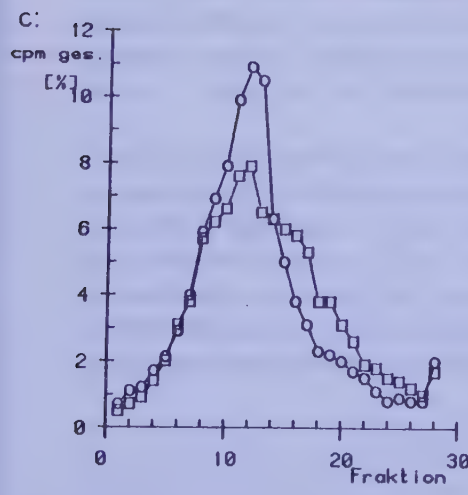
Der größere Anteil reifender DNA kann eine geringere irreversible Hemmung durch Aphidicolin oder, durch die längere Dauer des Chase, ein Fortschreiten im Replikationsprogramm bedeuten, wodurch mehr initiierte Replikons an der Reihe sind zu elongieren. DNA, die nicht wächst, wird bevorzugt zu Beginn des Blocks markiert, da sich ab 8 Stunden Block pulsmarkierte DNA nach dem Chase nur noch im Bereich ab 50 S befindet.

Wird der Hemmstoffblock aufgehoben, dann befindet sich nach 30 Minuten Pulsmarkierung die Radioaktivität in einem breiten Gipfel in Gradientenmitte (Abb. 24), sowohl, wenn man direkt nach Blockaufhebung markiert, als auch noch eine Stunde danach. Das mittlere Molekulargewicht des Gradienten, bezogen auf die Radioaktivität der Probe, $\bar{M}_W$, beträgt in der asynchronen Kontrollkultur (Abb. 24 d) 94×10^6 Dalton und ist etwa 1,5 mal kleiner als das einer direkt und eine Stunde nach aufgehobenem Methotrexatblock markierten Kultur (138 und 144×10^6 Dalton) (Abb. 24 a).

Schvartzman und Krimer (148) finden ein schnelleres Verschmelzen ("joining") von Replikationsintermediaten in Abhängigkeit von der Konzentration an dTTP. Ein solcher Mechanismus könnte hier auch vorliegen, wenn man davon ausgeht, daß Replikationsintermediate unter Methotrexatblock durch Thymidinmangel nicht weiterverarbeitet werden können. Durch Wiederauffüllen des Thymidin-Pools nach Blockaufhebung erscheinen, durch Verschmelzen der benachbarten Fragmente, innerhalb einer halben Stunde bevorzugt markierte DNA-Moleküle von Replikongröße (70 - 80 S) und darüber. In Rattenfibroblasten akkumulieren ebenfalls Intermediate in Replikongröße, die durch DNA-Synthese in den Lücken zwischen den replizierten Bereichen ("gaps") nach Aufheben eines Aphidivolinblocks zu hochmolekularer DNA verschmelzen (140). Nach Aufheben der mit Aphidicolin oder Methotrexat und Aphidicolin gehemmten Zellkulturen ist das $\bar{M}_W$ der Gradienten zunächst um etwa ein Drittel kleiner als das der Kontrollkultur, erreicht aber eine Stunde später das $\bar{M}_W$ der Kontrollkultur (Abb. 24 b, c, d). Dies läßt sich mit der durch Aphidicolin


a:
cpm ges.
[%]
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion


b:
cpm ges.
[%]
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion


c:
cpm ges.
[%]
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

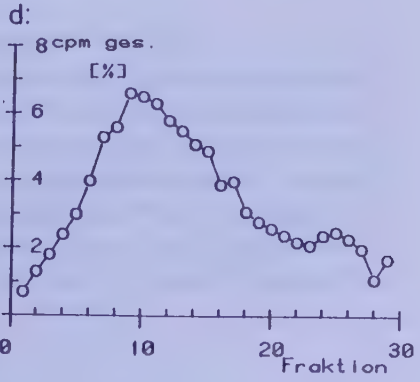

d:
8cpm ges.
[%]
6
4
2
0
10
20
30
Fraktion

Abb. 24: Größenverteilung synthetisierter DNA synchroner Zellen nach Aufheben des Blocks durch Hemmstoffe. Zonalzentrifugation (3.2.1.), Hemmstoffblock für 12 Stunden nach 3.2.3., Pulsmarkierung nach 3.3.5., alkalische Sucrosegradientenzentrifugation, kurzer Lauf.

Sofort nach Blockaufhebung O

1 Stunde danach □

a: Methotrexatblock nach 3.2.3.

Σ cpm 22 311 $\bar{M}_W = 138 \times 10^6$ D

Σ cpm 24 688 $\bar{M}_W = 144{,}3 \times 10^6$ D

b: Aphidicolinblock (1 µg/ml) nach 3.2.3.

Σ cpm 423 975 $\bar{M}_W = 76{,}3 \times 10^6$ D

Σ cpm 777 811 $\bar{M}_W = 98{,}7 \times 10^6$ D

c. Methotrexat- und Aphidicolinblock

Σ cpm 50 557 $\bar{M}_W = 78{,}6 \times 10^6$ D

Σ cpm 87 864 $\bar{M}_W = 93{,}5 \times 10^6$ D

d: Asynchrone Kultur, 2 Stunden nach Einsaat markiert

Σ cpm 11 268

$\bar{M}_W = 93{,}6 \times 10^6$ D

---

gehemmten Elongation erklären, wodurch unter Block kleinere DNA-Moleküle, eventuell durch Aktivierung von mehr Replikationsursprüngen (153) entstehen, die nach Blockaufhebung bevorzugt miteinander verschmelzen.

Auf eventuell auftretende Reparatursynthese wurde nicht näher eingegangen. Deren Ausmaß war in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen nach Aufheben eines Methotrexatblocks nicht groß genug, um die Ergebnisse beeinflussen zu können (82). Der Einfluß des Aphidicolins auf die Reparatursynthese ist noch nicht vollständig geklärt (135 - 139) und müßte an diesen Zellen und den speziellen experimentellen Bedingungen untersucht werden.

4.1.2.9. Diskussion und Zusammenfassung

Durch Zonalzentrifugation selektionierte G1-Zellen wurden durch die Hemmstoffe Methotrexat und Aphidicolin gehindert die S-Phase zu durchlaufen. Unter den experimentellen Bedingungen ließ sich die DNA-Synthese nicht vollständig unterdrücken. Unter Methotrexatblock hielt sie bis zu 8 Stunden gleichmäßig an, unter Aphidicolin- oder Methotrexat- und Aphidicolinblock bis zu zwölf Stunden. Ähnliches wurde von Fridland (83) unter Methotrexatblock mit menschlichen Lymphoblasten beobachtet. Nach Blockaufhebung steigt die Syntheserate stark an.

Die beiden Hemmstoffe haben ganz unterschiedliche Effekte auf die Synthese von Replikationsintermediaten. Unter Methotrexatblock werden zunehmend kleinere Moleküle markiert, größere Moleküle werden nicht weiter repliziert. Sie werden deshalb nicht pulsmarkiert, erscheinen aber in der Dauermarkierung. Auch die Zahl der neuinitiierten Replikons nimmt während des Blocks, parallel zum verminderten Einbau, ab. Gekeler (81) fand nach 8 - 12 Stunden Methotrexatblock selektionierter G1-Zellen ebenfalls einen Abfall der Syntheserate, und nach Blockaufhebung ein sofortiges Wiederansteigen des Einbaus in säurefällbare Radioaktivität. Durch Dauermarkierung während dieser Zeit akkumulierte DNA mit einem $\bar{M}_w$ von 10^7 Dalton, die direkt nach Blockaufhebung während 30 Minuten auf $1{,}7 \times 10^7$ Dalton wuchs.

In den ersten vier Stunden des Blocks erscheint eine Fraktion markierter kurzer DNA-Moleküle, die bis zu 2,5 Stunden nach Blockaufhebung nicht wächst. Dies steht teilweise im Widerspruch zu Fridland, der fand, daß DNA um 80 S akkumuliert, die nach Blockaufhebung mit derselben Geschwindigkeit reift, wie DNA aus vorher nicht gehemmten Zellen. Die gesamte markierte DNA dieser Zellen reifte während drei Stunden.

Aphidicolin verringert die Gabelgeschwindigkeit, ohne die Syntheserate während der Blockdauer zu verringern. Die Zellen betreiben somit unter Block in stark verringertem Ausmaß DNA-Synthese. Neusynthetisierte DNA wächst langsam, Neuinitiationen scheinen nicht gehemmt zu sein. Wie aus den faserautoradiographischen Ergebnissen entnommen werden kann, steigt die relative Initiationshäufigkeit sogar an (4.1.3.).

Auch unter Aphidicolinblock wird durch Dauermarkierung eine Fraktion von Molekülen gefunden, die nicht wächst. Andererseits findet keine bevorzugte Markierung auch von DNA-Molekülen in der Größe kleiner Replikons, wie im Fall des Methotrexatblocks, statt.

4.1.3. Faserautoradiographie

4.1.3.1. Einleitung

Die Technik der Faserautoradiographie wurde 1966 von Cairns entwickelt, der damit in Hela-Zellen die durchschnittliche Gabelgeschwindigkeit bestimmte. Huberman und Riggs verfeinerten die Technik durch Behandlung der Zellen mit Fluor-Desoxyuridin, einem Hemmstoff der Thymidilatsynthetase, das die Pools für dTTP-Vorläufer sinken ließ, so daß die Markierung mit angebotenem ^{3}H-Thymidin abrupt einsetzte (11). Die Verwendung von Fluor-Desoxyuridin wird allerdings diskutiert (80). Huberman und Riggs waren es auch, die als erste die Markierung nach dem heiß/warm-Schema verwendeten (149). Von Yurov, Cohen, Jasny und Tamm wurde das Markierungsverfahren durch unterschiedlich lange heiße und warme Markierungszeiten variiert, wodurch teilweise Fehler bei der experimentellen Anordnung entdeckt werden können.

Von Yurov wurden auch einzelne Zellen lysiert. Er konnte so die DNA-Replikation einer einzelnen Zelle verfolgen (11). Ockey (151) unterschied mit dieser Methode replikative und Reparatursynthese einzelner Zellen.

Mittels Faserautoradiographie wurden schon vor längerer Zeit Hinweise auf das derzeitige Replikationsmodell erhalten (149, 152). Die einzelnen durch Faserautoradiographie bestimmbaren Parameter, wie Interinitiationsabstand, Gabelgeschwindigkeit und relative Initiationshäufigkeit, variieren je nach System sehr stark. Sie sind insbesondere von der Zellart, dem Entwicklungsstadium, den Wachstumsbedingungen und der experimentellen Technik abhängig. Die Gabelgeschwindigkeit kann zwischen den Extremwerten von 0,1 µm/Minute bis zu 2,5 µm/Minute in CHO-Zellen variieren (11). In Ehrlich-Aszites-Tumorzellen variiert sie in den bisher gemachten Untersuchungen zwischen 0,57 und 1,35 µm/Minute (80, 98).

Die hier benützte Markierungsmethode orientierte sich an dem heiß/warm-Schema (3.9.). Die besonderen Probleme bei der Auswertung dieser Methode liegen darin, daß man eine den experimentellen Bedingungen angepaßte Markierungszeit wählen muß, um zu verhindern, daß Replikationseinheiten noch während des heißen Pulses miteinander verschmelzen. Zum anderen müssen genügend große Strecken gegenüber der Korngröße markiert werden. Die Auflösungsgrenze der Faserautoradiographie liegt bei 1,5 - 5 µm.

Die Markierungsbedingungen müssen so gewählt werden, daß der Meßfehler gegenüber der markierten Strecke möglichst gering ist.

Die Wahrscheinlichkeit, große Interinitiationsabstände zu erkennen, ist geringer als die, kleine zu erkennen, da der Zusammenhang oft nicht eindeutig ersichtlich ist, oder Strangbrüche häufiger vorkommen. Die Zuordnung größerer Replikons wird durch das veränderte Markierungsschema nach Cohen, Jasny und Tamm (152) erleichtert. Der Nachteil ist, daß während des warmen Pulses initiierte Replikons nicht entdeckt werden.

Das hier verwendete Schema in Anlehnung an Blütters (98) lieferte vergleichbare Ergebnisse mit den früheren Untersuchungen an diesen Zellen.

4.1.3.2. Einfluß verschiedener Temperaturen auf die DNA-Replikation

Die Methode der Faserautoradiographie sollte in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis verstärkter Replikoninitiationen bei erniedrigter Gabelgeschwindigkeit dienen. Zunächst wurde vom Synchronisationsschema: Zonalzentrifugation zur Selektion von G1 Zellen und 12 Stunden Anaerobie ausgegangen. Es war bekannt (83, 91), daß sich durch Inkubation der Zellen bei tieferen Temperaturen das Wachstum neusynthetisierter DNA verlangsamen ließ. Zunächst wurden Faser-

autoradiographien von Zellen, die bei verschiedenen Temperaturen inkubiert worden waren, angefertigt, um die Veränderung der Gabelgeschwindigkeit festzustellen (Tab. 1). Asynchrone Zellen wurde nach zwei Stunden in vitro-Kultur in temperierten Inkubationsgefäßen bei 20, 25 und 30° C für die angegebenen Zeiten, nach einer Äquilibrierungszeit von 30 Minuten, markiert. Aus den Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß durch Senken der Temperatur die Gabelgeschwindigkeit geringer wird. Der im Vergleich zu früheren Untersuchungen erheblich kleinere Interinitiationsabstand (30 - 55 µm) fällt auf. Die relative Initiationshäufigkeit bewegt sich im Rahmen früherer Bestimmungen.

Zur Anfertigung der Faserautoradiographien synchroner Zellen wurden je 0,5 ml der Zellkultur direkt nach Wiederbelüften zu 0,5 ml konditioniertem Medium (3.1.7.), enthaltend 80 µCi ^{3}H-Thymidin, in temperierten Gläsern gegeben und für die angegebenen Zeiten markiert (Tab. 1 b). Es ergibt sich kein einheitliches Bild. Die Gabelgeschwindigkeit bei den verschiedenen Temperaturen liegt an der unteren Grenze der früher in diesen Zellen bestimmten (98) oder sogar darunter (80). Die sehr kleine Gabelgeschwindigkeit der bei 30° C markierten Zellen wird wahrscheinlich durch die zu lange Markierungszeit verursacht, wodurch schnellere Replikons während der heißen Markierung miteinander verschmelzen, und somit nicht ausgewertet werden. Der Interinitiationsabstand liegt im Rahmen des früher in asynchronen und kurz nach Wiederbelüften anaerober, asynchroner Zellen bestimmten. Die relative Initiationshäufigkeit liegt an der unteren Grenze früher bestimmter Werte (80, 98). Damit scheint dieses Synchronisationsschema zur Anreicherung initiierender Strukturen nicht geeignet zu sein. Hier wirken sich wahrscheinlich viele verschiedene Effekte aus, deren Klärung viel Aufwand erfordern würde.

4.1.3.3. Einfluß von Sauerstoffentzug und Aphidicolin auf die DNA-Replikation

Die Anzahl der aktivierten Replikationsursprünge ist je nach System verschieden. Wie vor allem von Taylor (153) diskutiert worden war, aktivieren Zellen, die am Anfang der S-Phase stehen und an der Progression in die S-Phase gehindert werden, zusätzliche Replikationsursprünge. Er arbeitete mit CHO-Zellen, die am Anfang der S-Phase mit Fluor-Desoxyuridin gehemmt wurden. Mit zunehmender Dauer der Fluor-Desoxyuridineinwirkung wurden zusätzliche Replikationsursprünge aktiviert, die etwa 4 µm voneinander entfernt lagen. Er konnte in der Zeit von 10,5 - 24 Stunden nach der Zellteilung, bei gleichzeitiger Fluor-Desoxyuridinbehandlung, keine Änderung in der Syntheserate, wohl aber eine stark verminderte Gabelgeschwindigkeit feststellen (178). Verminderte Gabelgeschwindigkeiten findet man auch mit den Hemmstoffen Cycloheximid, Hydroxyharnstoff, Puromycin und Dinitrophenol (150). Im Gegensatz dazu war sie bei Gekeler (80) unter Cycloheximid nicht vermindert. Von Rainaldi et al. (142) wurde vorgeschlagen, daß die Blockierung der Kettenverlängerung durch Inhibitoren der DNA-Synthese ein Signal für die Zellen sein könnte, mehr Replikationsursprünge zu aktivieren. Weiterhin verknüpft sich die Vorstellung damit, daß das Replikationsprogramm vor allem in der frühen S-Phase trotz Inhibitor weiterläuft. Beides würde zur Anreicherung kurzer neusynthetisierter DNA-Moleküle führen.

Durch sequentielle Anwendung von Anaerobie und Aphidicolin sollten zuerst Initiationen unterdrückt werden. Nach Wiederbelüftung sollten die neuinitiierten Replikons durch Aphidicolin am Kettenwachstum gehindert werden. Asynchrone Zellen wurden dazu 5 Stunden anaerobisiert, 30 Minuten ab Wiederbelüftung mit verschiedenen Aphidicolinkonzentrationen im Medium inkubiert und dann die angegebenen Zeiten markiert (Tab. 1 c) (Abb. 25). Die Gabelgeschwindigkeit der Kultur ohne Aphidicolin entspricht früher bestimmten Werten (80, 98), während unter Aphidicolineinwirkung die Gabelgeschwindigkeit konzentrationsabhängig abnimmt.

Faserautoradiographisch erfaßte Parameter

Tabelle 1:

a) Asynchrone Zellen nach 2 Stunden in vitro-Kultur wurden während den angegebenen Zeiten bei 20, 25 und 30° C nach 3.9. markiert und verarbeitet.

Schema	$\frac{\mu m}{\text{Min. x Gabel}}$	SD	n	ID [µm]	SD	n	PO	PR	PO in % d. Summe
30° C 2 x 30 Min.	0,577	0,329	153	37	23	41	121	79	61
25° C 2 x 60 Min.	0,273	0,12	88	54	9	15	50	45	53
20° C 2 x 180 Min.	0,08	0,051	104	45	32	13	77	53	64

b) Nach 3.2.1. durch Zonalzentrifugation und 12 Stunden Anaerobie synchronisierte Zellen wurden in 0,5 ml Aliquots direkt nach Belüften zu 0,5 ml konditioniertem Medium gegeben und die angegebenen Zeiten bei 25, 30 und 37° C nach 3.9. markiert und verarbeitet.

Schema	$\frac{\mu m}{\text{Min. x Gabel}}$	SD	n	ID [µm]	SD	n	PO	PR	PO in % d. Summe
37° C 2 x 30 Min.	0,5	0,25	186	66	48	19	73	112	46
30° C 2 x 45 Min.	0,264	0,116	135	87	35	25	57	75	51
25° C 2 x 60 Min.	0,495	0,235	211	80	48	41	68	117	27

c) Asynchrone Zellen wurden nach 5 Stunden Kultur unter Anaerobie 5 Minuten vor dem Wiederbelüften mit verschiedenen Mengen an Aphidicolin versetzt. Die angegebene Markierung begann nach weiteren 30 Minuten.

Schema: 5 Stunden Anaerobie asynchrone Zellen ↓ Aphidicolin ⟶ 30 Minuten Aerobie ⟶ Markierung

Schema	µm / Min. x Gabel	SD	n	ID µm	SD	n	PO	PR	PO in % d. Summe
2 x 30 Min. ohne Aphidico.	0,626	0,325	188	240	399	26	59	101	37
2 x 60 Min. 0,25µg/ml	0,073	0,035	259	29	16	46	178	135	57
2 x 30 Min. 0,05µg/ml	0,206	0,108	294	34	19	31	139	151	48
2 x 30 Min. 0,01µg/ml	0,574	0,195	193	65	23	18	41	98	30

µm / Min. x Gabel	Gabelgeschwindigkeit
SD	Standardabweichung
n	Anzahl der Messungen
ID	Interinitiationsabstand
PO	"post-pulse"-Initiation
PR	"pre-pulse"-Initiation

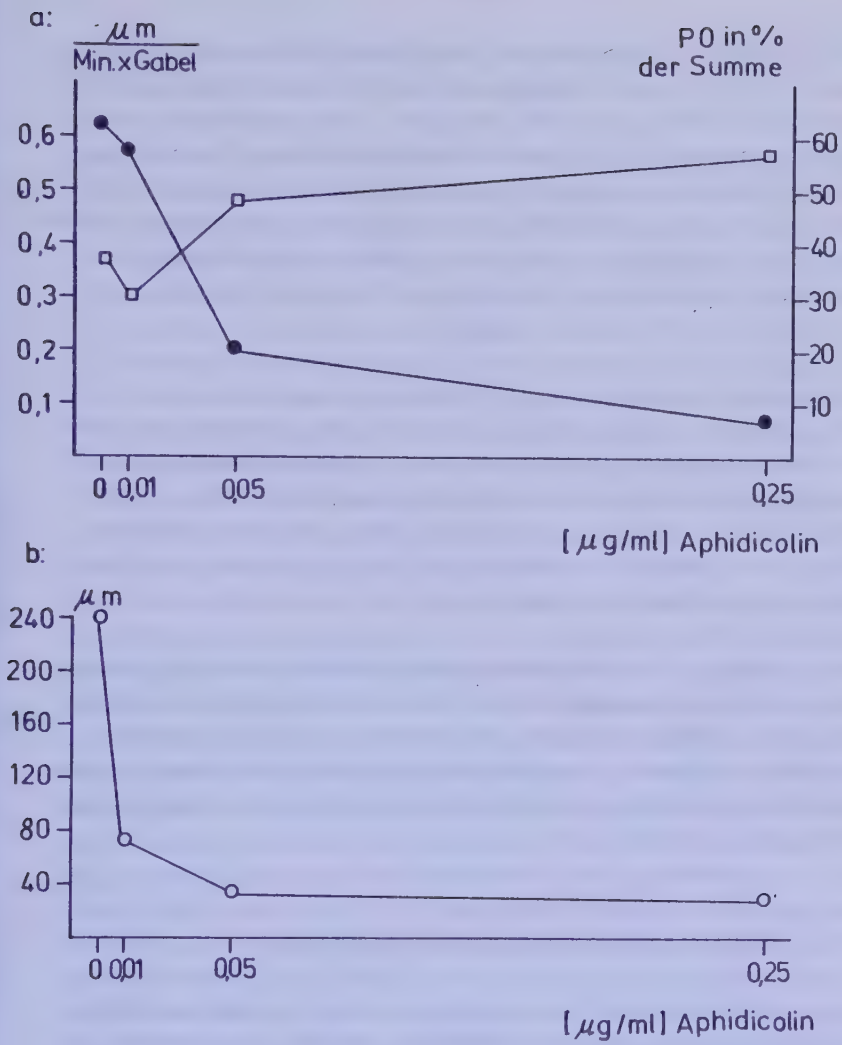


Abb. 25: Abhängigkeit von Gabelgeschwindigkeit (a, ●), Interinitiationsabstand (b, ○) und relativer Initiationshäufigkeit (a, □) von der Aphidicolinkonzentration.
Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 1 c.

Der Interinitiationsabstand der Kontrollkultur ist mit 240 µm extrem hoch. Es ist bekannt, daß er in diesen Zellen unter Anaerobie stark ansteigen kann (45). Hier kommt aber wahrscheinlich ein großer Bestimmungsfehler dazu, da nur eine kleine Anzahl von Interinitiationsabständen vermessen werden konnte. Die Abweichung vom Mittelwert ist dadurch größer als der Mittelwert selbst. Große Abweichungen vom Mittelwert sind realistisch und sind im Normalfall etwa halb so groß wie der Mittelwert selbst.

Interessant im Fall der mit Aphidicolin gehemmten Kulturen ist, daß der Interinitiationsabstand mit Erhöhung der Aphidicolinkonzentration abnimmt. Eine Fehlermöglichkeit liegt in der durch die verringerte Gabelgeschwindigkeit notwendigen längeren Markierungszeit bei hohen Aphidicolinkonzentrationen. Dadurch stehen die Zellen verschieden lange Zeiten unter Aphidicolineinwirkung.

Die relative Initiationshäufigkeit verhält sich umgekehrt. Während die Kontrolle frühere Ergebnisse bestätigt, nimmt sie unter Aphidicolin mit der Konzentration zu. Zusammengenommen sprechen diese Befunde für die Vorstellung, daß am Gabelfortschreiten gehemmte Zellen zusätzliche Replikationsursprünge aktivieren.

4.2. Diskussion der Synchronisationsmethoden

Das vorläufige Ziel der Arbeit war, Ehrlich-Aszites-Tumorzellen in einen Zustand zu bringen, in dem initiierende Replikons angereichert sind. Als Ausgangsmaterial bieten sich G1-Zellen an, die aber durch geeignete Maßnahmen weiter synchronisiert werden müssen, da während der G1-Phase Heterogenitäten bezüglich der inidividuellen G1-Phasendauern auftreten. Einen kurzen Überblick über Synchronisationsmethoden gibt Gekeler (80). Damit lassen sie sich grundsätzlich in folgende Kategorien einteilen:

(a) Synchronisationsmethoden mittels physikalischer Methoden nach Größe, Dichte und Gestalt, und

(b) mittels Hemmstoffen, die in einen für die DNA-Synthese wichtigen Schritt eingreifen. Hemmstoffe können auch zur Aufklärung von Mechanismen beitragen, wie im Fall des Aphidicolins, das einen ganz spezifischen Angriffspunkt auf der α-Polymerase hat, und das somit für Studien in diesem Zusammenhang benützt werden kann. Vor kurzem (154) ist eine temperatursensitive Mutante aus FM3A-Zellen der Maus charakterisiert worden, die eine temperatursensitive α-Polymerase besitzt. Dies ist meines Wissens das erste Mal, daß eine Zellzyklusmutation eines höheren Eukaryonten mit einem spezifischen Defekt korreliert worden ist (155).

Der Zellzyklus unterliegt vielen regulatorischen Vorgängen. Die DNA-Synthese selbst wird unter anderem auch von membranabhängigen Prozessen und Veränderungen von Ionenpotentialen beeinflußt (156, 31, 44, 98). Von besonderem Interesse ist die Rolle des Calciums. Die Konzentration des Calcium-bindenden Proteins Calmodulin erhöht sich in CHO-K1-Zellen in der späten G1- und frühen S-Phase auf das Doppelte (43). In einigen Zellarten, BHK und Maus 3T3, erhöht sich der Ap_4A-Spiegel bis zu 1 000 fach am Beginn der S-Phase (157, 29). Ein weiterer interessanter Zusammenhang scheint zwischen der Atmungskette und der Proliferation zu bestehen. Dieser Effekt kommt nicht nur in der sauerstoffabhängigen Proliferation und DNA-Synthese der Ehrlich-Aszites-Tumorzellen zum Ausdruck, sondern auch durch die Effekte von Hemmstoffen und Entkopplern der Atmungskette (36 - 39), und Hemmstoffen der Dihydroorotatdehydrogenase, die die Vorläufer für die DNA-Synthese liefert (34, 35).

Das hier angewendete Synchronisationsschema, Zonalzentrifugation und Anaerobie, versucht diese Zusammenhänge auszunützen. Grundsätzlich wurden die Ergebnisse von Gekeler (80)

reproduziert. Es stellte sich aber heraus, daß die Zellen nicht immer in gleichem Maße darauf ansprachen. Das zeigen sowohl die Einbauversuche, als auch die Auswertungen der Faserautoradiographie (4.1.1.3. und 4.1.3.2.). Unter Umständen ist dies durch nicht kontrollierbare anaerobe oder hypoxische Bedingungen erklärbar.

Ein schlecht verfolgbarer Vorgang ist die nach Wiederbelüften in stärkerem Ausmaß ablaufende Reparatursynthese (25).

Inkubation anaerober Zellkulturen mit Desoxycytidin lieferte Hinweise auf eine Initiationen stimulierende Aktivität, was mit den impulszytofluorimetrischen Untersuchungen von Löffler (35) im Einklang steht. Über die Dihydroorotatdehydrogenase könnte die Kopplung an die Atmungskette erklärt werden. Die Stimulierung durch Desoxycytidin reichte aber für eine starke Anreicherung von Initiationen nicht aus.

Am erfolgversprechendsten war die Synchronisation mittels Hemmstoffen. Mit Methotrexat lassen sich selektionierte G1-Zellen sehr gut synchronisieren. Die sich nach Blockaufhebung anschließende S-Phase scheint in ihrem Verlauf nicht gestört zu sein (79). Methotrexat-resistente G1-Zellen der CHOC-400-Zellen, die eine 135 kB-Sequenz 400 mal amplifiziert haben, treten innerhalb dieser amplifizierten Sequenz unter Aphidicolin und Hydroxyharnstoff mit demselben Replikationsmuster in die S-Phase ein, wie Zellen ohne Behandlung mit Hemmstoff.

Die Akkumulierung kurzer DNA-Moleküle unter Methotrexatblock ließ sich in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen reproduzieren (81). Nach Blockaufhebung setzte die DNA-Synthese sehr rasch und in starkem Ausmaß ein. Die Einbaudaten zusammen mit den Gradientenprofilen (4.1.2.7. und 4.1.2.6.) legten den Verdacht nahe, daß unter Methotrexatblock anfangs, wenn die Thymidinvorräte noch größer sind, noch relativ viel Kettenwachstum stattfindet. Erst nach und nach, mit dem Erschöpfen des endo-

genen Thymidin-Pools, werden kürzere DNA-Moleküle markiert. Eine faserautoradiographische Untersuchung würde sich zur Beantwortung dieser Frage anbieten.

Zur Hemmung der Elongation wurde zusätzlich Aphidicolin verwendet. Wie aus den Ergebnissen der Faserautoradiographie deutlich hervorgeht, ist die Gabelgeschwindigkeit bei einer Aphidicolinkonzentration von 0,25 µg/ml bereits auf ein Zehntel herabgesetzt (4.1.3.3., Tab. 1 c). Nach Eintritt synchroner Zellen in die S-Phase akkumulieren, so wie im Fall des Methotrexatblocks, kurze DNA-Stücke. Ihr Wachstum wird aber nicht komplett gehemmt, sondern nur stark verlangsamt (4.1.2.6., Abb. 18 a). Durch die Kombination der beiden Hemmstoffe, Methotrexat und Aphidicolin, werden nur kurze DNA-Moleküle markiert, die unter Block nicht wachsen. In L-Zellen gehören unter Hydroxyharnstoff synthetisierte DNA-Moleküle zu den mittelrepetitiven Sequenzen (159) (s. 4.4.).

Nicht endgültig geklärt wurde das Erscheinen markierter DNA der Größe kleiner Replikons (70 S) zu Beginn des Methotrexatblockes und nicht reifender DNA zu Beginn jeglichen Blockes (Methotrexat, Aphidicolin, Methotrexat und Aphidicolin). Da diese DNA jeweils nur zu Beginn des Blocks markierbar war könnte es sich um restliche S-Zellen handeln, die unter Block irreversibel geschädigt werden. Dies könnte mittels Zellautoradiographie nachgewiesen werden, wenn nur ein Teil der Zellen markiert wird.

Ein Beitrag der mitochondrialen DNA Replikation, die ja vom Zellzyklus unabhängig stattfindet, kann nicht ausgeschlossen werden. Unter Methotrexatblock betrug der Anteil der mitochondrialen DNA-Synthese in Lymphoblasten maximal 10 % (83). Aphidicolin hat keinen Einfluß auf die mitochondriale DNA-Synthese (87). Dadurch, daß markierte DNA meist größer ist als mitochondriale DNA und pulsmarkierte DNA in jedem Fall reift, ist eine starke Beteiligung mitochondrialer DNA-Synthese sehr unwahrscheinlich.

4.3. Elektronenmikroskopische Analyse neusynthetisierter DNA

4.3.1. Einleitung

Elektronenmikroskopische Studien replizierender DNA aus Eukaryonten wurden in den 70er-Jahren an Hefe (161), Drosophila (162), Seeigelembryonen (164), Physarum polycephalum (165) und BHK-Zellen (30) gemacht. Die einzelnen Organismen boten sich aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften für verschiedene Fragestellungen an. Das Hefegenom ist mit 9×10^9 Dalton relativ klein und deshalb leicht handhabbar. Durch Dichtemarkierung und isopyknische Zentrifugation konnte eine Fraktion erhalten werden, in der 31 % der Moleküle replizierende Strukturen tragen. Keine Anreicherung replikativer Strukturen ist bei DNA aus Drosophila- oder Seeigelembryonen nötig. Aufgrund ihrer schnellen Teilungszyklen tragen sie sehr viele replikative Strukturen (bis zu 33,5 % der Moleküle). Auch sie stellen einen Spezialfall dar. Höhere und nicht so teilungsaktive Organismen oder differenzierte Zellen müssen in der Regel synchronisiert werden, um eine Anreicherung replikativer Strukturen für elektronenmikroskopische Untersuchungen durchführen zu können. Das Ausmaß der sonst anfallenden Sisiphusarbeit ist bei Bäzner (101) beschrieben. Durch Ausnützen der synchronen Teilungszyklen der Plasmodien von Physarum polycephalum erreicht man, daß immerhin noch 10 % der Moleküle replikative Strukturen tragen. Asynchrone, differenzierte Zellen, wie BHK-Zellen (30), besitzen auf 0,14 % der Moleküle Replikationsaugen.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen replizierender DNA bestätigen in wesentlichen die Vorstellung von der eukaryontischen DNA-Replikation. Die häufigsten im Elektronenmikroskop beobachtbaren Replikationsintermediate sind die bereits erwähnten Replikationsaugen neben den Gabeln. Kriterium für ein Auge ist im wesentlichen, daß die beiden

Schenkel gleich lang sind. Eine Gabel ist eigentlich jede echte Verzweigung, die nicht durch laterale Aggregation oder Überlagerung zweier oder mehrerer Moleküle entstanden ist. Zum Beispiel nach erschöpfendem Restriktionsverdau der DNA kann verlangt sein, daß die beiden Gabelzinken gleichlang sein müssen. Eine Abhandlung solcher Probleme findet sich bei Bäzner (100).

Terminationsstrukturen sind solche, bei denen sich zwei laufende Gabeln einander nähern.

Andere Formen an replikativen Intermediaten können in Chloroplasten und mitochondrialer DNA sichtbar gemacht werden. Sie bilden nach der Initiation der Replikation einen D-Loop aus (166). Kinetoplasten-DNA, das Analogon der Trypanosomen zu mitochondrialer DNA, repliziert nach dem Cairns-Typ in den "minicircles" und nach dem "Rolling-circle"-Typ in den "maxicircles" (167).

Eine immer wieder auftauchende Frage ist die nach einzel- oder doppelsträngiger DNA in den Replikationsintermediaten. Replikative Strukturen enthalten einzelsträngige DNA (122), die zu ihrer Isolierung benützt werden kann. Die Verteilung und Größe dieser einzelsträngigen Bereiche ("gaps") kann etwas über den Replikationsmechanismus aussagen. Sie wurden für die bereits erwähnten Drosophila-Embryonen genauer untersucht (162, 163). Die Replikationsintermediate einer der Stränge der Kinetoplasten DNA der "minicircles" in Trypanosomen besteht aus 20 - 110 Nukleotiden langen Molekülen neusynthetisierter DNA, die zum L-Strang komplementär ist. Weniger als 5 % der L-Strang-DNA bleibt einzelsträngig (167).

Während der Replikation von Drosophila-Embryonen, Physarum polycephalum und ribosomaler DNA aus Xenopus laevis, lassen sich im Elektronenmikroskop cluster von sehr kleinen Augen ("microbubbles") darstellen. Sie haben meist etwa 300 Basenpaare lange Schenkel, die von 100 - 5000 Basenpaaren reichen

können. Da ihr Auftreten mit der DNA-Synthese korreliert, sowohl zeitlich als auch räumlich, werden sie als Replikationsintermediate betrachtet. Permeabilisierte BHK-Zellen in der G1-Phase sollen nach Behandlung mit Ap_4A solche kleinen Augen anreichern (30). Die kleinen Augen sind zum Teil einzelsträngig, da sie nach S1-Verdau in geringerer Zahl wiedergefunden werden. In optimalen Präparationen ist eine Unterscheidung zwischen einzel- und doppelsträngiger DNA direkt auf dem elektronenmikroskopischen Bild möglich.

Probleme bei der Darstellung der kleinen Augen tauchen auf, weil die in ihnen über Wasserstoff-Brücken gebundenen, neusynthetisierten kurzen DNA-Moleküle instabile Strukturen sind. Sie lösen sich in Abhängigkeit von Bedingungen, wie Ionenkonzentration in der Lösung, Temperatur, leicht denaturierende Bedingungen oder Konformation der DNA (171) durch sogenannte Gabelwanderung ("branch migration") von der Parental-DNA ab (164, 170, 171). Dabei hybridisieren die beiden Tochterstränge miteinander. Auch die sogenannten "whisker" an Gabelungen entstehen auf diese Weise (162). Wie von Helftenbein gezeigt wurde (25), brechen Replikationsintermediate bevorzugt an ihren einzelsträngigen Bereichen, und entziehen sich so einer Analyse. Deshalb wurde von ihr eine schonende DNA-Isolierungsmethode entwickelt, die hochreine und mit replikativen Intermediaten angereicherte DNA liefert.

Mittels elektronenmikroskopischer Analyse konnte in einigen Systemen die Lokalisierung von Replikationsursprüngen bestimmt werden. In Lytechinus variegatus (66) und Xenopus laevis (168, 172) ist er im nicht-transkribierten Spacer lokalisiert. Die Untersuchung von rDNA bietet den Vorteil, daß die Gene 200 und bis 500 mal im Genom hintereinander wiederholt vorkommen. Da sie eine vom restlichen Genom unterschiedliche Schwebedichte haben, kann man sie als Satellit im Dichtegradienten abtrennen. Nach Restriktionsverdau können die den Replikationsursprung enthaltenden Bereiche über die Lokalisierung der Replikationsaugen auf den Fragmenten bestimmt

werden. Daß diese Methode erfolgreich eingesetzt werden kann, zeigte die Übereinstimmung des Ergebnisses mit den Verhältnissen bei anderen Organismen. Amplifizierte Dihydrofolatreduktase-Gene wurden ebenfalls, nach Restriktionsverdau des sie tragenden Genoms und elektronenmikroskopischer Analyse, zur Lokalisierung des Replikationsursprungs benutzt (173).

In dieser Arbeit sollten initiierende Strukturen beim Eintritt in die S-Phase von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Aus dem Vorangegangenen ist ersichtlich, auf welche Probleme zu achten war:

- die Zellen müssen am Anfang der S-Phase sehr gut synchronisiert sein,

- sie müssen initiierende Strukturen anreichern,

- die DNA-Isolierung muß so schonend sein, daß Einzelstränge enthaltende DNA bei der Aufarbeitung nicht vorzugsweise gespalten wird,

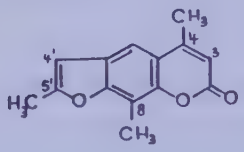
- die isolierte DNA muß zusätzlich an Replikationsintermediaten angereichert werden,

- durch die Aufarbeitung und Präparation für das Elektronenmikroskop dürfen instabile Strukturen nicht zerstört werden.

Die im folgenden verwendete Synchronisationsmethode wurde in 4.1.2.8. beschrieben. Zur Isolierung der DNA und zur Anreicherung replikativer Strukturen wurde im wesentlichen die von Helftenbein (25) ausgearbeitete Methode benützt (3.4.2.). Zur Vermeidung der Gabelwanderung wurde versucht, die DNA in den Zellen querzuvernetzen.

4.3.2. Trioxsalen

Trioxsalen (4,5',8-Trimethylpsoralen) gehört zu den natürlich vorkommenden Furocoumarinen. Es hat folgende Struktur:



Seine Reaktion mit DNA erfolgt in 2 Stufen. Im ersten Schritt interkaliert es in der Dunkelreaktion zwischen den Basen der DNA-Doppelhelix. Durch Licht von 320 - 400 nm reagiert es dann in einer Cycloaddition an der 4',5'-, oder 3,4-C-C-Doppelbindung mit der 5,6-C-C-Doppelbindung des Thymidins. Die 4',5'-Addition am Thymidin führt in einer zweiten Stufe zum Diaddukt mit einer Lichtabsorption zwischen 320 und 380 nm. Diese Reaktion ist beim Trioxsalen stark begünstigt. Photoreversion bei 260 nm ist möglich. Die Reaktion und ihre Stereochemie sind sehr gut untersucht (104 - 106, 111).

Durch die Quervernetzung der DNA werden keine Knicke und Strangbrüche verursacht. Pro gebundenem Trioxsalenmolekül verlängert sich das DNA-Molekül um soviel wie ein zusätzliches Basenpaar ausmachen würde (184).

Quervernetzung durch Trioxsalen wurde dazu benützt, Chromatin in vivo zu untersuchen. Durch Proteine geschützte Stellen können nicht quervernetzt werden. Nach denaturierender Spreitung der DNA kann man im Elektronenmikroskop geschützte von nicht-geschützten Bereichen anhand ihrem mehr oder weniger denaturierten Zustand unterscheiden. Nicht durch Proteine verdeckte Bereiche auf der DNA lassen sich so hoch quervernetzen, daß sie selbst nach vollständiger Denaturierung noch doppelsträngig erscheinen. Durch Proteine geschützte Bereiche erscheinen als Blasen, die an ihren Enden quervernetzt sind

(107 - 109, 112, 113). Trioxsalen ist auch zur Fixierung von Sekundärstrukturen verwendet worden (107), und zur Anreicherung und Isolierung von DNA-Molekülen, die den Replikationsursprung enthalten (175).

4.3.3. Quervernetzung der DNA in vivo

Um die Gabelwanderung kleiner DNA-Moleküle zu verhindern, wurde versucht, DNA in den Zellen durch Trioxsalen so hoch querzuvernetzen, daß eine große Wahrscheinlichkeit bestand, neusynthetisierte DNA am Parentalstrang zu fixieren.

Direkt aus einer Maus entnommene Zellen wurden gewaschen und mit Trioxsalen nach 3.6. verschieden oft behandelt. Anschliessend wurden die Zellen nochmals gewaschen und die DNA nach 3.4.2. isoliert. Die verschiedenen DNA-Proben wurden für das Elektronenmikroskop nach Denaturierung präpariert (3.10.2.). Aneinanderliegende Blasen konnten so dargestellt werden (Abb. 26). Ab einer 6-maligen Trioxsalenbehandlung erscheinen auch größere scheinbar doppelsträngige Bereiche. Die einzelsträngige DNA der Blasen wurde in ihrer Länge vermessen (3.10.4. und Tab. 2 a). In Abhängigkeit von der Trioxsalenbehandlung ergab sich eine reproduzierbare mittlere Blasenlänge. Bei der Längenmessung wurde davon ausgegangen, daß einzel- und doppelsträngige DNA dieselbe Konturlänge hat.

Der dadurch bedingte Fehler ist gering (108). Der Fehler durch die Präparation doppelsträngiger DNA beträgt etwa 4 - 5 % (101).

Durch zehnmalige Behandlung mit Trioxsalen war ein erheblicher Anteil der Moleküle nach denaturierender Präparation für das Elektronenmikroskop scheinbar doppelsträngig (wurde nicht ausgewertet). Die mittlere Länge der Blasen betrug etwa 280 Basen. Das Histogramm der Längenverteilung überdeckt einen nur sehr kleinen Bereich, so daß also die DNA in vivo sehr effektiv quervernetzt worden ist (Abb. 27).

Abb. 26: Bilder in vivo quervernetzter und nach 3.10.2. denaturierend gespreiteter DNA. Zwischen den Blasen sind scheinbare Doppelstrangbereiche erkennbar. Quervernetzung nach 3.6. für 4-mal.

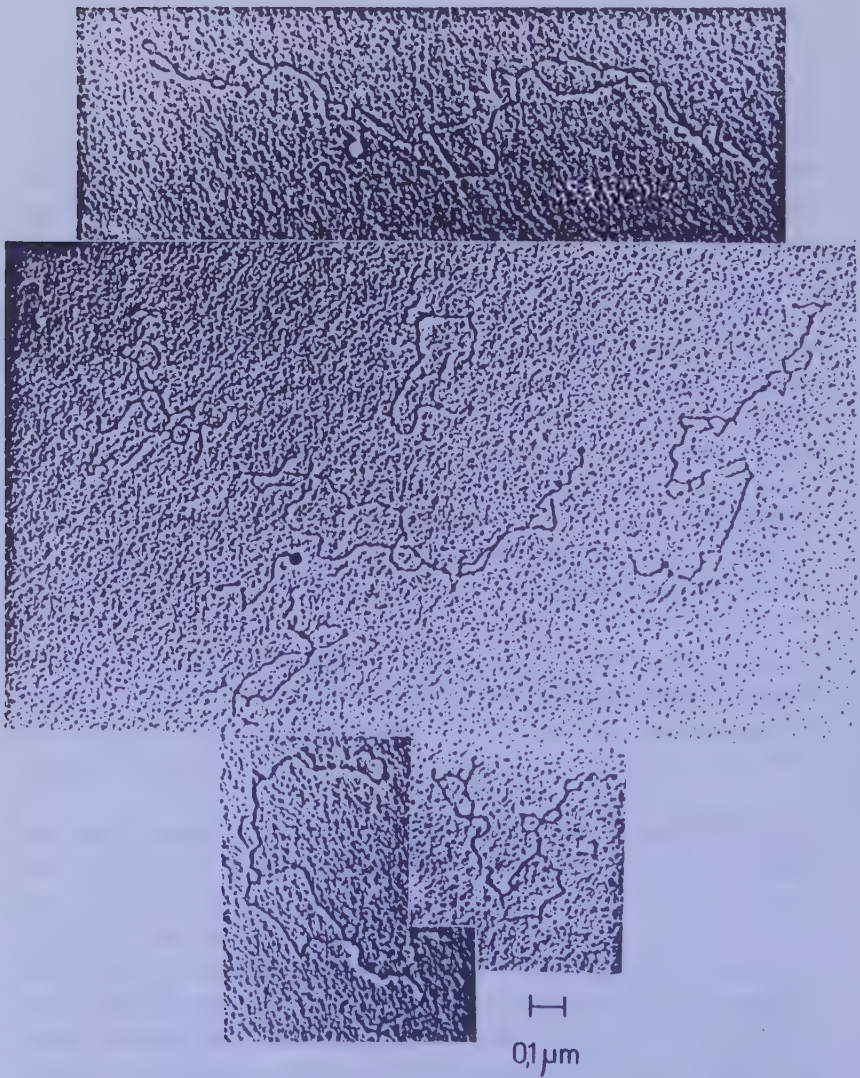


Tabelle 2:

a: Länge der Schenkel der Blasen nach denaturierender Spreitung quervernetzter DNA.

Asynchrone Zellen wurden direkt nach Entnahme aus der Maus zweimal mit Hanks-Lösung gewaschen und nach 3.6. quervernetzt; die DNA-Isolierung erfolgte nach 3.4.2., die denaturierende Spreitung nach 3.10.2., die Auswertung nach 3.10.4..

Anzahl der Bestrahlungen	Anzahl der gemessenen Längen	mittlerer Abstand der Quervernetzungen (Bp)
3	26	406
4	224 (150)	551 (590)
6	29 (160)	398 (430)
10	168 (80)	282 (275)

( ): zweite Isolierung

b: Länge der DNA-Moleküle nach nicht-denaturierender Spreitung quervernetzter und nicht quervernetzer DNA.

Anzahl der Bestrahlungen	Anzahl der gemessenen Längen	mittlere Länge [µm]
0	78	2,14
10	49	1,9

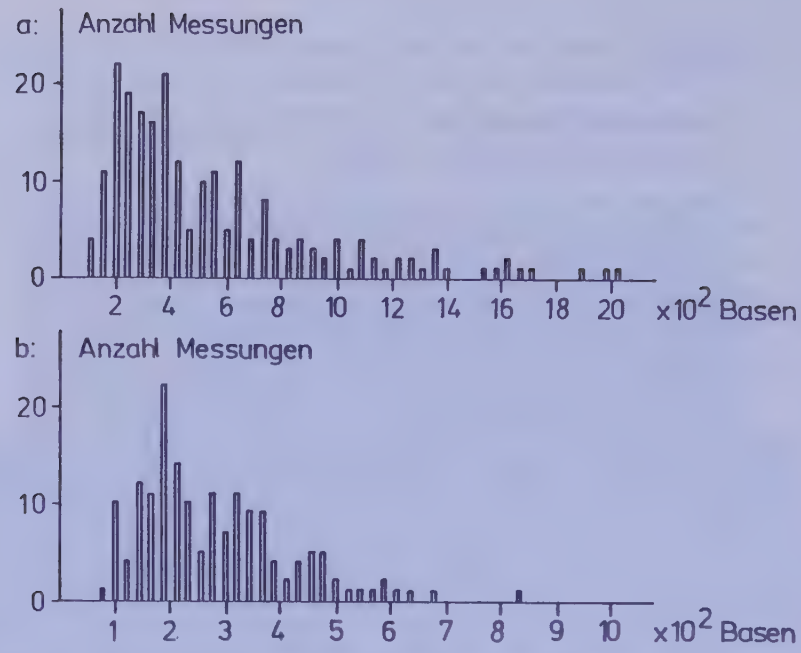
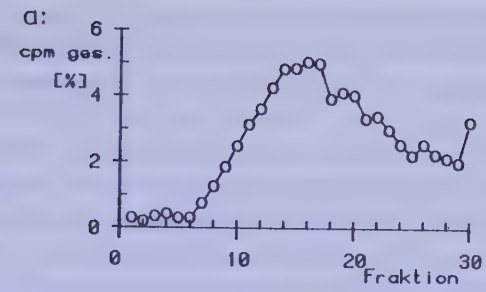
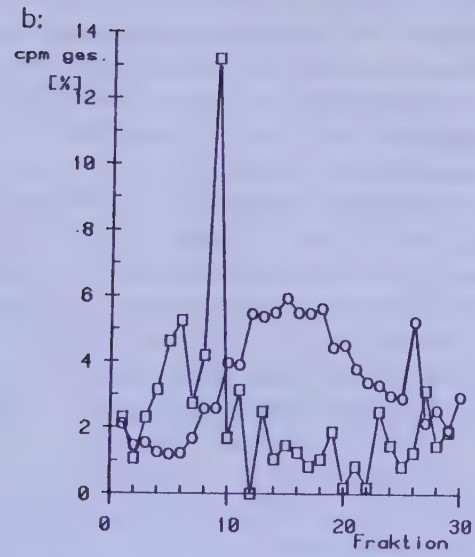


Abb. 27: Längenverteilung der Schenkel der Blasen der Tabelle 2 a.
a: 4 Bestrahlungen
224 Messungen
b: 10 Bestrahlungen
168 Messungen

Daß der DNA kein Schaden zugefügt wird, ist aus der mittleren Länge quervernetzter und nicht-quervernetzter DNA aus einer Isolierung nach Präparation unter nicht-denaturierenden ersichtlich (Tab. 2 b).

Daß quervernetzte DNA nicht mehr denaturierbar ist, sollte sich auch im alkalischen Sucrosegradienten nachweisen lassen. Insbesondere sollten neusynthetisierte kleine DNA-Moleküle nach Quervernetzung nicht wieder auffindbar sein. Dies wurde ebenfalls als Kriterium der effektiven Quervernetzung genommen.


a:
cpm ges.
[%]
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion


b:
cpm ges.
[%]
14
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

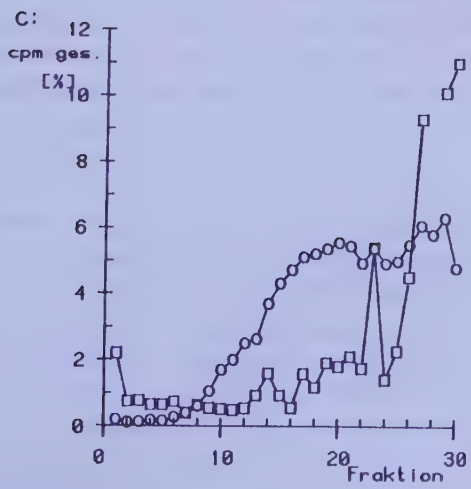

c:
cpm ges.
[%]
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

Abb. 28: Sedimentation quervernetzter und nicht quervernetzter DNA im alkalischen Sucrosegradienten, langer Lauf bei 28 000 rpm für 35 Stunden.

Selektionierte G1-Zellen (3.2.1.) wurden 10 Stunden unter Methotrexat- und kombiniertem Methotrexat- und Aphidicolinblock kultiviert (3.2.3.) und gleichzeitig dauermarkiert (3.3.6.) (1,7 µCi/ml ^{3}H-Desoxycytidin).
Nach 10-maliger Bestrahlung eines Teils der Zellen (3.6.) wurden jeweils 10^{6} Zellen nach 3.8.1. lysiert und nach 3.8.2. zentrifugiert (0,75 S/Fraktion).

nicht quervernetzt

quervernetzt

a: Methotrexat-Block

$\sum$ cpm 4 534 $\bar{M}_n$ = 142 580

$\sum$ cpm 52

b: Methotrexat- und Aphidicolin-Block (Aphidicolin 2 µg/ml)

○ $\sum$ cpm 3 780 $\bar{M}_n$ = 36 448

□ $\sum$ cpm 476

c: Asynchrone Zellkultur ohne Hemmstoffe

○ $\sum$ cpm 18 678 $\bar{M}_n$ = 289 768

□ $\sum$ cpm 7 978

Selektionierte G1-Zellen wurden zu dessen Überprüfung nach 4.1.2.8. 10 Stunden unter Methotrexat- und Aphidicolinblock gesetzt und nach 3.3.6. dauermarkiert. Zur Kontrolle wurde eine asynchrone Kultur ohne Hemmstoffe in derselben Weise markiert. Nach 10-maliger Trioxsalenbehandlung je eines Teils der Zellen nach 3.6. wurden jeweils etwa 10^6 Zellen auf dem alkalischen Sucrosegradienten nach 3.8.2. lysiert und 35 Stunden bei 28 000 rpm und 23° C zentrifugiert. Durch Eichung mit Eco RI-verdauten λ-DNA-Fragmenten ergab sich 0,75 S/Fraktion des Gradienten (vgl. 15), (Abb. 28). Hochmolekulare DNA mit S-Werten ab 22,5 sedimentiert unter diesen Bedingungen. Im Bereich von 1000 - 2000 Basen ließen sich 20 % der Radioaktivität der asynchronen Zellen nicht an hochmolekulare DNA quervernetzen, bei mit Methotrexat gehemmten Zellen waren es 0,8 % und bei mit Methotrexat und Aphidicolin geblockten Zellen 9 %. Das mittlere Molekulargewicht des Gradienten, bezogen auf die Anzahl der Moleküle in den einzelnen Fraktionen, $\overline{M}_n$, verhält sich bei nicht quervernetzter DNA erwartungsgemäß. Es beträgt in der mit Methotrexat und Aphidicolin behandelten Kultur 36 500 Dalton und ist etwa viermal kleiner als das der mit Methotrexat behandelten Kultur mit 143 000 Dalton. Diesen Molekulargewichten entsprechen 110 und 430 Basen. Das kleinere Molekulargewicht der DNA aus der mit beiden Hemmstoffen behandelten Kultur stimmt mit der Vorstellung der Elongationshemmung durch Aphidicolin überein. Gleichzeitig erhöht sich durch die Akkumulierung kurzer DNA-Moleküle die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Teil nicht quervernetzt wird, wie es durch den Anteil an nicht quervernetzter DNA auf dem Gradienten zum Ausdruck kommt.

Der im Vergleich dazu hohe Anteil nicht sedimentierender DNA aus der asynchronen Kultur läßt sich damit erklären, daß sie besser durch Proteine geschützt ist, als die synchronen Kulturen. Die Quervernetzung der DNA in vivo schien in der gewünschten Weise zu erfolgen.

4.3.4. Analyse der replikativen Strukturen aus am Anfang der S-Phase angereicherten Zellen

Es wurden mehrere DNA-Aufarbeitungen nach 3.4.2. gemacht. Sie berücksichtigt die besonderen Eigenschaften neusynthetisierter DNA. Durch den Restriktionsverdau von Zellkernen wird die DNA, solange sie noch nicht in scherempfindlichem Zustand ist, zu scherunempfindlichen Fragmenten verdaut. Nach Ebinger (14) entstehen unter diesen Bedingungen Fragmente einer mittleren Länge von 3 µm.

Ausgangsmaterial für die DNA-Aufarbeitungen waren zum einen synchrone G1-Zellen, die nach 4.1.2.8. 10 Stunden unter Methotrexat oder Methotrexat- und Aphidicolinblock kultiviert worden waren. Zum anderen wurden auch asynchrone Zellen direkt aus der Maus als Ausgangsmaterial verwendet. In jeder Aufarbeitung wurden die Zellen mittels Nitrozellulose-Chromatographie (3.4.2.6.) an replikativen Strukturen angereichert. Die nicht-bindende Fraktion wird als TBS- und die bindende Fraktion als SDS-Fraktion bezeichnet. Letztere ist an replikativen Strukturen angereichert. Die sich anschliessende Präparation für das Elektronenmikroskop erfolgte nach Bäzner (100). Ausgewertet wurden zunächst Moleküle, die Augen oder/und Gabeln enthalten (Tab. 3). Wäre die DNA erschöpfend mit Eco RI verdaut, dann müßte man als Kriterium für eine Gabel zwei gleich lange Gabelzinken annehmen. Da aber nur etwa ein Viertel aller Eco RI-Stellen für den Verdau zugänglich sind, ist es möglich, daß eine Gabel zwei ungleiche Gabelzinken hat. Deshalb wurde im übrigen nach den Kriterien von Bäzner (100, 101) vorgegangen.

In den Aufarbeitungen der mit Methotrexat und Aphidicolin gehemmten Kulturen, die außerdem quervernetzt waren, trugen nach der Nitrozellulose-Chromatographie 4 - 5 % der Moleküle der SDS-Fraktion Augen und 3,3 - 3,7 % der Moleküle Gabeln (Tab. 3 und Abb. 29). Dies war im Vergleich zu den anderen Aufarbeitungen, zusammen mit dem einer nur mit

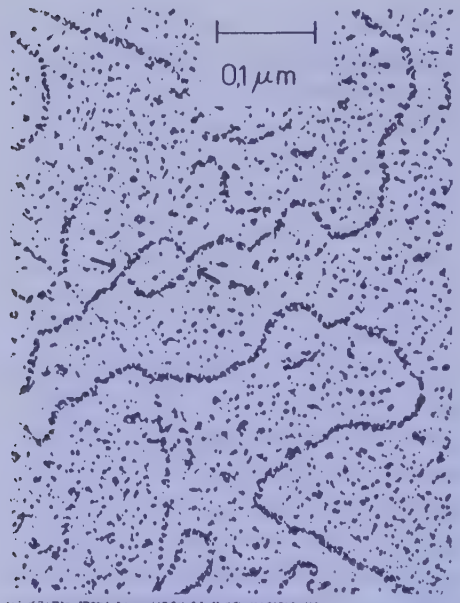
Tabelle 3: Prozentzahlen der Moleküle, die elektronenmikroskopisch sichtbar replikative Strukturen (Augen und Gabeln) tragen

Zellen	Quervernetzung	Fraktion der Nitrozellulose-Chromatographie	% Augen	% Gabeln
G 1, MTX und Aphidicolin	ja	SDS	5 (4,2)	3,7 (3,3)
G 1, MTX und Aphidicolin	ja	TBS	0,5 (2,3)	3,4 (3,4)
G 1, MTX und Aphidicolin	nein	SDS	0,3 (6)	0,9 (1)
G 1, MTX und Aphidicolin	nein	TBS	1,3 (0,3)	2,7 (0,5)
G 1, MTX	ja	SDS	(4,4)	(9)
G 1, MTX	ja	TBS	2,6 (1,8)	3,7 (4,3)
asynchron	ja	SDS	1,4	1,6
asynchron	ja	TBS	2,7	1,9
asynchron	nein	SDS	0,5	3,3
asynchron	nein	TBS	0,7	1,9

G1-Zellen nach 3.2.1.
Hemmstoffblock nach 3.2.3., für 10 Stunden
Nitrozellulosechromatographie nach 3.4.2.6.
( ) geben jeweils die erste Isolierung an

Methotrexat synchronisierten und quervernetzten Kultur, das beste Ergebnis. Es ist eine vier- bis fünffache Verbesserung der Anreicherung von Replikationsaugen im Vergleich zu Bäzner (101). Neben Replikationsaugen wurden auch immer Gabeln gefunden, die nach den Gradientenprofilen auch zu erwarten waren (4.1.2.8.), vor allem in den nur mit Methotrexat behandelten Kulturen.

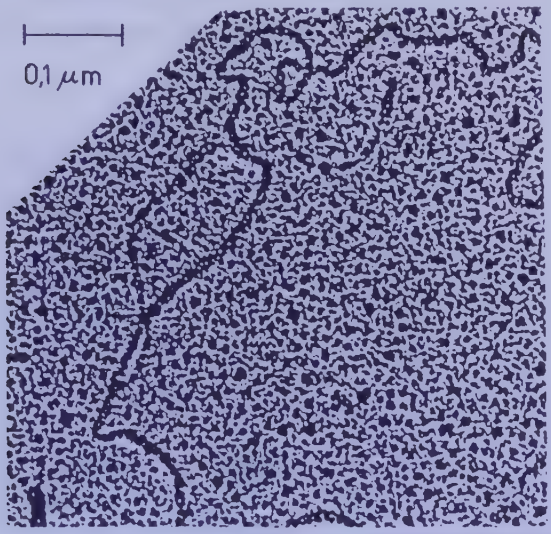
Abb. 29: Darstellung einiger im Elektronenmikroskop beobachtbarer DNA-Strukturen



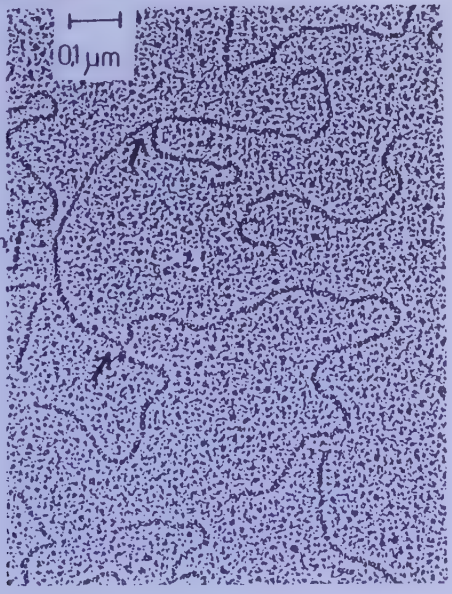
a: kleines Replikationsauge aus einer mit Methotrexat und Aphidicolin nach 4.1.2.8. synchronisierten Kultur. Die DNA wurde in vivo quervernetzt. Länge der Schenkel: 0,124 und 0,119 µm. Übereinstimmung der Schenkellängen: 96 %.

b: Größeres Replikationsauge aus einer wie in a synchronisierten Kultur. Die DNA wurde in vivo quervernetzt. Länge der Schenkel: 1,26 und 1,22 µm. Übereinstimmung der Schenkellängen: 97 %.

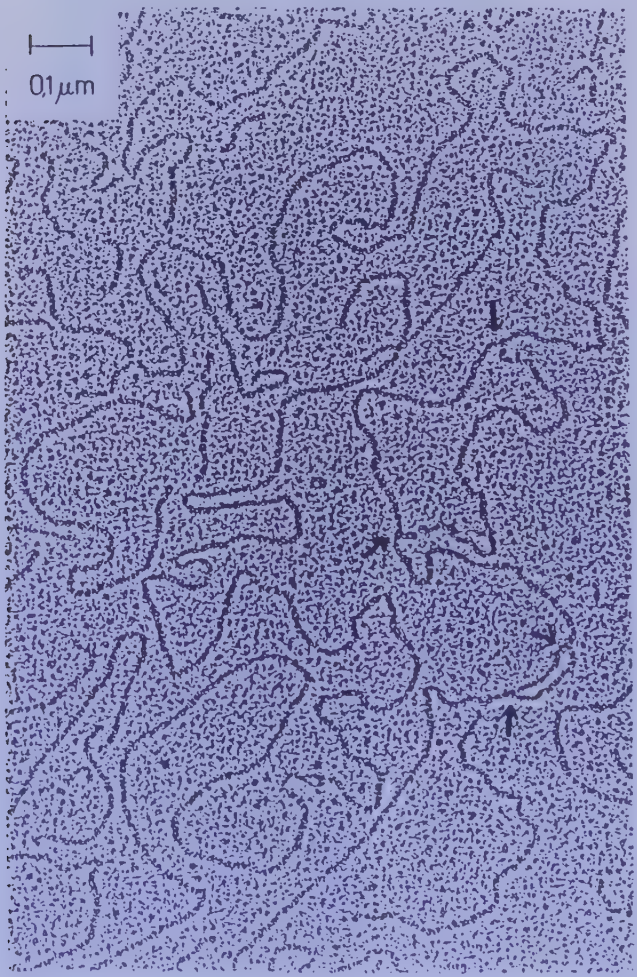
c: Replikationsauge mit einzel- und doppelsträngigem Schenkel. Ansonsten ist alles gleich wie in a.



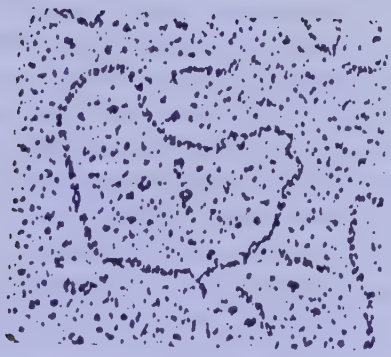
d: Vorbehandlung wie in e. Die Längen der Gabelzinken betragen, von unten nach oben: 0,67 µm, 0,39 µm, 1,57 µm, 0,68 µm. Das Stück zwischen den Gabeln ist 0,72 µm lang.



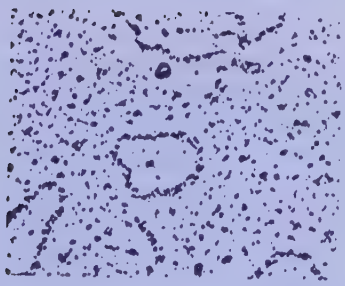
e: Zwei Replikationsaugen auf einem Molekül mit Gabelungen an den Enden. Aus einer mit Methotrexat nach 4.1.2.8. synchronisierten und mit Trioxsalen behandelten Kultur. Größe der Augen: 0,173 µm und 0,82 µm. Übereinstimmung der Schenkellängen: 83 %.



f: Bilder zweier ringförmiger Moleküle. Herkunft wie in a.



Konturlänge: 0,78 µm



Konturlänge: 0,194 µm

In den TBS-Fraktionen befanden sich in unterschiedlichem Ausmaß ebenso Augen wie Gabeln. Dies ist durchaus möglich, wenn man annimmt, daß sie keine einzelsträngige DNA enthalten. Als andere Möglichkeit kommt nur in Frage, daß keine Anreicherung einzelsträngiger DNA durch Nitrozellulosechromatographie stattgefunden hat. Aber etwa 80 % hitzedenaturierter, nach 3.4.1. isolierter DNA wird von Nitrozellulose gebunden. Ein Verlust replikativer Strukturen durch die Nitrozellulose-Chromatographie wurde nicht bemerkt. Absolute Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Anreicherung replikativer Strukturen kam nicht vor. Meistens traten kleine Abweichungen auf. Nur im Fall der mit Methotrexat und Aphidicolin gehemmten und nicht quervernetzten Kultur wurde in zwei aufeinanderfolgenden identischen Aufarbeitungen in der SDS-Fraktion ein völlig anderes Ergebnis erhalten. Eventuell ist dies auf die Instabilität der Augen zurückzuführen (Tab. 3).

Die Auswirkung der Quervernetzung der DNA ist deutlich erkennbar. Quervernetzte DNA enthält mehr replikative Strukturen als nicht quervernetzte. Somit scheint im Gegensatz zu Befunden von Spotila und Huberman (176) die Quervernetzung doch zur Erhaltung replikativer Strukturen beizutragen.

Auffallend war, daß der überwiegende Teil der Augen sehr klein und im Bereich von 400 Basenpaaren lag (Abb. 30). 28 Augen von verschiedenen Präparationen einer mit Methotrexat und Aphidicolin synchronisierten Kultur wurden möglichst zufällig abfotografiert und die Längen mit einem Cursor (3.10.4.) vermessen. Da die Augen alle sehr klein sind und der Meßfehler deshalb relativ groß ist, wurde eine Differenz der beiden Schenkel von 20 % des längeren Schenkels zugelassen. Bei Zakian (163) differierten die beiden Schenkel bei einer mittleren Länge aller Moleküle von $2{,}73 \times 10^3$ Basen um 10 %. 50 % der Augen waren allerdings gleich oder kleiner als $0{,}9 \times 10^3$ Basen. Die Fehlergrenze von 20 % scheint

mir daher zulässig zu sein. Zur Messung der Größe der Augen wurde immer der längere Schenkel genommen, da kleine Einzelstrangbereiche kollabieren können und so den Schenkel verkürzen.

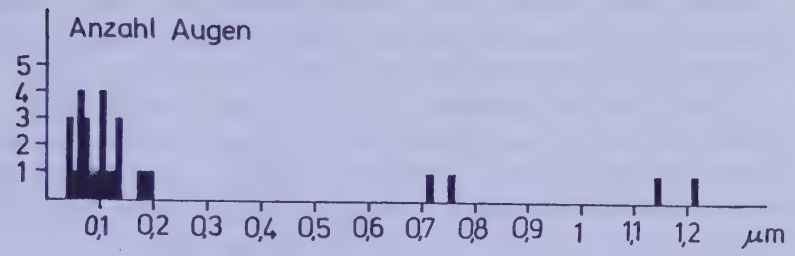


Abb. 30: Histogramm aus 28 vermessenen Replikationsaugen. DNA aus einer mit Methotrexat und Aphidicolin synchronisierten Kultur (4.1.2.8.); SDS-Fraktion. Augen aus verschiedenen Aufarbeitungen und Präparationen wurden zufällig fotografiert und mit einem Cursor (3.10.4.) vermessen. Eine Längendifferenz der beiden Schenkel von 20 % des Längeren wurde zugelassen. Der jeweils längere Schenkel wurde aufgetragen (s. Text).

Die Größenverteilung der Augen ist relativ eng. Nur zwei der vermessenen Augen sind um ein über Zehnfaches größer. Läßt man sie bei der Berechnung des Mittelwertes außer acht, dann ergibt sich eine mittlere Länge der Augen von $0{,}152 \pm 0{,}179$ µm. Das entspricht etwa 455 Basenpaaren. Auch ein paar Augen der SDS-Fraktion aus einer nur mit Methotrexat synchronisierten Kultur lagen in diesem Größenbereich (0,06 - 0,17 µm, 4 Augen). Die Größenverteilung kann aber erst dann als gesichert gelten, wenn noch mehr Augen vermessen werden. Dieses Ergebnis ist aber trotzdem interessant, weil die Augen in den Größenbereich der "microbubbles" und der von Grummt beobachteten kleinen Augen, nach Ap_4A-Behandlung permeabilisierter BHK-Zellen in der G1-Phase, fällt.

Markierte DNA-Moleküle in diesem Größenbereich wurden auch durch alkalische Sucrosegradientenzentrifugation gefunden (Abb. 28 und 31 b).

Interessant wäre die Beantwortung der Frage, ob die DNA der kleinen Augen einzel- oder doppelsträngig ist (164). Durch Hellfeld-Elektronenmikroskopie kann sie nicht beantwortet werden, da einzelsträngige Bereiche in den kleinen Augen nur sehr schlecht beobachtbar sind. Durch hochauflösende Dunkelfeldelektronenmikroskopie (177) sollte dies aber möglich sein. Von Baldari und Amaldi (114) wurden Mechanismen der Entstehung von kleinen Augen diskutiert. Ihre Entstehung und ihre Bedeutung ist aber nicht geklärt.

Einmal wurden mehrere Augen auf demselben Molekül hintereinander gefunden. Der Abstand zwischen den beiden Augen ist kleiner als 1 µm. Die DNA-Quelle war eine mit Methotrexat synchronisierte Kultur. Aus einer solchen Kultur konnte auch eine Doppelgabel, die eine terminierende Struktur darstellt, präpariert werden. Ab und zu waren ringförmige Moleküle zu sehen. Ihre Konturlänge reichte bei acht Ringen von 0,114 - 1,11 µm; in einem Extremfall betrug sie 7,53 µm (s. Abb. 29 für Abbildungen der Moleküle).

4.4. Reassoziationsverhalten neusynthetisierter DNA aus am Anfang der S-Phase angereicherten Zellen

Zur Charakterisierung der am Anfang der S-Phase neusynthetisierten DNA wurde eine Reassoziationskinetik aufgenommen. Stimulierend wirkte, daß aus Ehrlich-Aszites-Tumorzellen neusynthetisierte DNA-Moleküle isoliert werden können, die einen Replikationsursprung tragen und eine mittelrepetitive Fraktion des Ehrlich-Aszites-Tumorzell-Genoms enthalten (175). Weitere solcher DNA-Moleküle wurden aus Lungenfibroblasten, Hela-Zellen, Guerin-Aszites-Tumorzellen isoliert (175, 179). Der Gedanke, daß Replikationsursprünge auf mittelrepetitiven

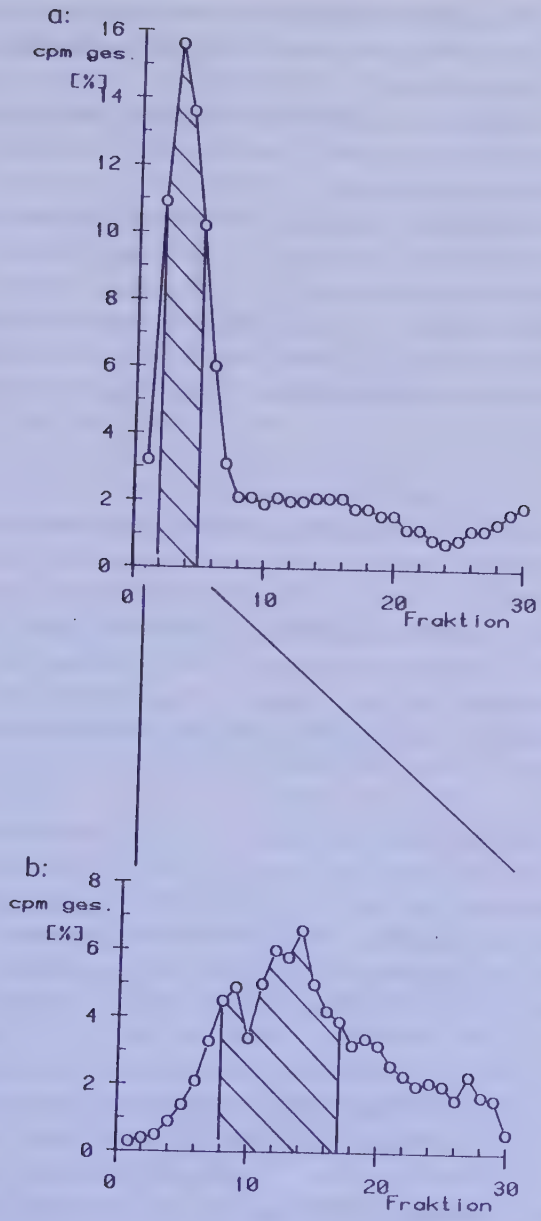

a:
cpm ges.
[%]
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion
b:
cpm ges.
[%]
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Fraktion

Abb. 31: Alkalische Sucrosegradientenzentrifugation zur Isolierung neusynthetisierter DNA nach 4.1.2.8. synchronisierter Zellen.
Dauermarkierung nach 3.3.6. mit 4 µCi/ml ^{3}H-Desoxycytidin
Aufgetragene Zellzahl pro Gradient etwa 10^{6}.
Gradientenvolumen: 34 ml
a: Zentrifugationsbedingungen: 6 Stunden, 26 000 rpm
Σcpm 16 197 4,93 S/Fraktion
b: Zentrifugationsbedingungen: 35 Stunden, 26 000 rpm
Σcpm 13 410 $\bar{M}_n$ = 146 700 0,845 S/Fraktion
Gepoolte Fraktionen sind schraffiert. Die sich entsprechenden S-Wert Bereiche der beiden Gradienten sind angedeutet.

Sequenzen oder in deren Nähe liegen, liegt nahe, da im eukaryontischen Genom normalerweise um 10^{4} Replikons vorhanden sind.

Da die nach 4.1.2.8. neusynthetisierte DNA synchronisierter Zellen einen mengenmäßig nur sehr kleinen Teil des Genoms ausmacht, war es sinnvoll, die Analyse des Reassoziationsverhaltens im Überschuß von Maus-Gesamt-DNA als "driver" auszuführen.

Die maßgebliche Konzentration im Ansatz wird durch die ^{14}C-markierte Gesamt-DNA bestimmt, die in der gewünschten Menge eingesetzt werden kann. Man erhält in einem Ansatz die Reassoziationskinetik der ^{14}C-Gesamt-DNA und der ^{3}H-markierten neusynthetisierten DNA, die man direkt vergleichen kann. Das Vorgehen ist in 3.11.1. beschrieben.

Die Reassoziation wurde durch Hydroxylapatit-Chromatographie verfolgt (3.11.2.). Bei dieser Standardmethode reichen etwa 50 Basenpaare zur Bindung an den Hydroxylapatit aus (56).

In vitro langzeitmarkierte DNA (3.3.2.) wurde nach 3.4.1. isoliert und 2 Minuten beschallt. Man erhält durch Beschallen so Moleküle zwischen 400 - 500 Basenpaaren.

Nach 4.1.2.8. synchronisierte Zellen wurden nach Lyse auf dem Gradienten im alkalischen Sucrosegradienten 6 und 35 Stunden zentrifugiert. Von jeweils 6 identischen Gradienten eines Rotors wurde aus je einem das Radioaktivitätsprofil bestimmt. Die die interessierende Radioaktivität enthaltenden Fraktionen der anderen Gradienten des Rotors wurden gepoolt. Die DNA der Fraktionen wurde nach 3.11.1. für die Reassoziationskinetik vorbereitet. Die Gradientenprofile zeigt Abb. 31 a, b.

Die Reassoziationskinetik der ^{14}C-markierten Gesamt-DNA aus beiden Ultrazentrifugenläufen zeigt den erwarteten Verlauf (Abb. 32). Das Mäusegenom enthält etwa 10 % Satelliten-DNA (150), die durch diesen Test nicht von invers repetitiver DNA ("snap-back"-DNA) unterschieden werden kann. Invers repetitive DNA soll auch eine Beziehung zu Replikationsursprüngen besitzen (101, 195).

Ein Anteil mittelrepetitiver Sequenzen um $c_o t$-Werte von 10^{-1} - 10^{1} ist vorhanden. Singuläre Sequenzen reassoziieren zwischen $c_o t = 10^{3} - 10^{4}$.

Neusynthetisierte DNA aus dem sechsstündigen Ultrazentrifugenlauf ist im Vergleich zu Gesamt-DNA an mittelrepetitiven Sequenzen mit $c_o t_{1/2} = 10^{-1}$ angereichert (der Anteil beträgt 20 - 30 %).

In DNA aus dem 35 Stunden-UZ-Lauf ist der Anteil der mittelrepetitiven Sequenzen mit etwa 80 % noch viel stärker angereichert. Der $c_o t_{1/2}$-Wert liegt bei etwa 10°. Dies ist zu erwarten, da die radioaktiv markierten DNA-Moleküle des kurzen Laufs nicht so gut nach ihrer Länge aufgetrennt werden können wie die DNA-Moleküle des langen Laufs. Es befinden sich deshalb in der gepoolten DNA des kurzen Laufs, im Vergleich zu der gepoolten DNA des langen Laufs, längere radioaktiv markierte Moleküle, die durch Beschallen zerlegt werden. So kann mittelrepetitive Sequenzen enthaltende DNA von nicht mittelrepetitive Sequenzen enthaltender DNA abgetrennt werden.

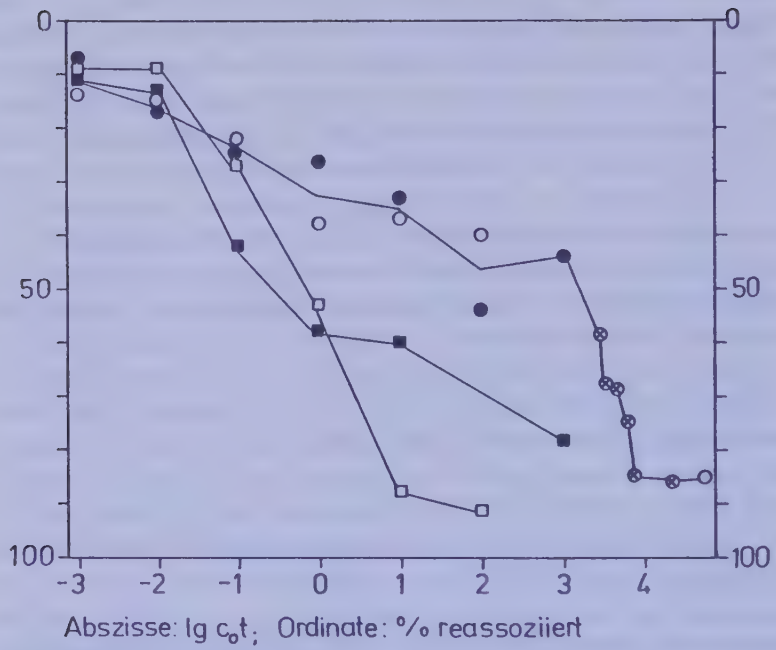


Abb. 32: Reassoziationskinetik von Ehrlich-Aszites-Tumorzell-DNA (3.11.) (4.4.).

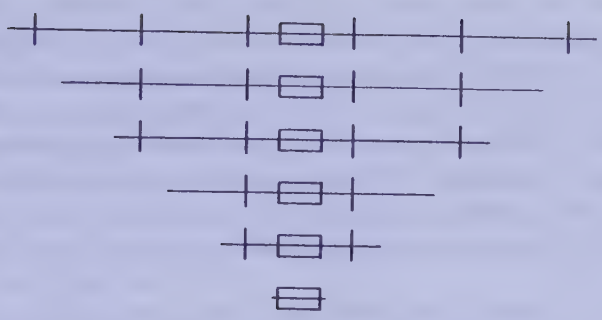
neusynthetisierte DNA aus Abb. 31a ■

neusynthetisierte DNA aus Abb. 31b □

^{14}C-markierte Maus-Gesamt-DNA im Ansatz mit DNA aus Abb. 30a. ●

^{14}C-markierte Maus-Gesamt-DNA im Ansatz mit DNA aus Abb. 30b. ○

^{14}C-markierte Maus-Gesamt-DNA ⊗



radioaktiv markierte DNA
mittelrepetitive Sequenz
Bruch durch Beschallen

In der DNA aus beiden UZ-Läufen ist der Anteil der Satelliten-DNA mit 8 - 12 % etwa gleich groß. Der größte Unterschied liegt im Anteil an singulärer DNA, der in der DNA aus dem langen Lauf um etwa 30 % geringer ist. Der Gradient des kurzen Laufs kann Moleküle bis 120 S umfassen. Er überdeckt den ganzen S-Wert-Bereich bis zur Auflösungsgrenze. Der lange Lauf trennt mit 0,845 S/Fraktion im Bereich kleiner S-Werte viel besser auf und reicht nur bis zu S-Werten von 24,5. Größere Moleküle sedimentieren. Aus diesem Gradienten wurden Moleküle von 6 - 13,5 S gepoolt. Das $\overline{M}_n$ des Gradientenprofils betrug 146 700 Dalton, was 440 Basen entspricht. Die gepoolten Fraktionen des kurzen Laufs umfaßten Moleküle von 5 - 25 S und stellen somit eine heterogenere Fraktion dar, wie es auch durch Reassoziationsanalyse bestätigt wurde.

4.5. Diskussion

Nach Arretierung einer synchronen Ehrlich-Aszites-Tumorzellpopulation in der frühen S-Phase während eines kombinierten Methotrexat- und Aphidicolinblockes werden DNA-Moleküle einer mittleren Länge um 400 - 500 Basen synthetisiert. Sie wurden im alkalischen Sucrosegradienten und im Elektronenmikroskop nachgewiesen. Eine Reassoziationsanalyse ergab eine starke Anreicherung an mittelrepetitiven Sequenzen in diesen kurzen DNA-Molekülen.

Vassilev, Russev und Anachkova (175, 179) konnten ebenfalls Moleküle mit mittelrepetitiven DNA-Sequenzen anreichern, die außerdem einen Replikationsursprung tragen sollen. Durch S1-Verdau der reassoziierten mittelrepetitiven DNA-Moleküle können sie andere Aussagen über die Eigenschaften der Moleküle machen, als es mit Hydroxylapatit-Chromatographie möglich ist. So ergab eine einfache Rechnung, daß die Länge des mittelrepetitiven Sequenzbereichs 200 - 300 Nukleotide umfaßt, was in etwa mit der Länge der bekannten viralen und bakteriellen nicht-kodierenden Bereiche um den Replikationsursprung übereinstimmt (2). Die durch dieselbe Methode gewonnenen Moleküle aus verschiedenen Zellen enthielten alle mittelrepetitive Anteile, die etwa 200 Basen umfaßten, Spezies-spezifisch waren und nicht in größerem Ausmaß transkribiert wurden. Im Zusammenhang damit ist interessant, daß virale und andere, eukaryontische, Replikationsursprünge (2, 66, 168, 172, 179) im nicht-transkribierten Teil zwischen Genen ("spacer") und Introns gefunden wurden.

Die von Vassilev und Russev aus Ehrlich-Aszites-Tumorzellen isolierte DNA enthielt 3 - 5 % invers repetitive Sequenzen,

15 - 20 % schnell reassoziierende, wahrscheinlich Satelliten-DNA und 70 % mittelrepetitive Sequenzen.

Zannis-Hadjopoulos et al. (195) fanden in am Anfang der S-Phase synchronisierten Mäuse-, Ratten- und Affenzellen mit einer qualitativen Methode eine Anreicherung an invers repetitiven Sequenzen in neusynthetisierter DNA. Neben einem großen Anteil mittelrepetitiver Sequenzen liegt demnach auch die Beteiligung invers repetitiver Sequenzen an der Bildung eines Replikationsursprunges nahe, wie es auch in Viren gefunden wird (2).

Mittelrepetitive Sequenzen machen aber bei der in dieser Arbeit und von Vassilev und Russev angewendeten Methode einen viel größeren Anteil aus. Deshalb sollen in diesem Zusammenhang die bekannten Familien repetitiver Sequenzen der Maus kurz beschrieben werden.

Repetitive DNA eines Genoms kann in mehrere Kategorien eingeteilt werden: Multigenfamilien enthalten einige wenige bis zu mehreren hundert von Mitgliedern. Satelliten-DNA besteht in der Regel aus vielen hunderten von kurzen, hintereinanderliegenden Sequenzen. Verstreut im Genom 10^4 - 10^6 mal wiederholte Sequenzen sind entweder nur ein paar hundert Basenpaare (SINES) oder einige tausend Basenpaare lang (LINES) (71). Mittelrepetitive Sequenzen der Maus scheinen sich in 5 Familien einteilen zu lassen (196). Sie machen 8 % des gesamten Genoms und 50 % der repetitiven Sequenzen ohne Satelliten-DNA aus. Die B1-Sequenzen entsprechen den Alu-Sequenzen der Primaten und sind ubiquitär im Mäusegenom verteilt. Sie bestehen aus 130 Basenbaaren, homolog zum 3'-Teil der menschlichen Alu-Sequenzen, die von AmCn-Blöcken (A = 2-8, C = 1-2) flankiert sind (73). Von den mehr als 30 000 Familienmitgliedern im Genom können nur einige Palindrome ausbilden. Interessanterweise ist Matrix-DNA synchronisierter 3T3-Zellen teilweise homolog zu den B1-Sequenzen (182). Die B2-Sequenzen umfassen 180 Basenpaa-

re (197), die von 15 Basenpaaren langen Wiederholungssequenzen eingefaßt sind. Beide, sowohl B1- als auch B2-Sequenzen werden, vor allem in Tumorzellen, durch RNA-Polymerase III transkribiert (196, 198). Die B1-Sequenz wird sehr effizient transkribiert, aber größtenteils wieder abgebaut. Vor allem die B2-Sequenz findet sich in zytoplasmatischen RNP-Partikeln wieder. In Ehrlich-Aszites-Tumorzellen wird sie nur von einem DNA-Strang transkribiert (197). Auf den Transkripten lassen sich beide in Introns und nicht-translatierten Bereichen von Genen lokalisieren.

Eine B2-ähnliche Sequenz, I. D., findet man im Rattengehirn. Die R-Sequenzen entsprechen dem 3'-Ende der L1Md (= Bam H 1 MIF-1)-Sequenzen und sind 400 - 500 Basenpaare lang. Die L1Md-Sequenz selbst erstreckt sich über 6,5 - 7 kB. Die fünfte mittelrepetitive Familie des Mäusegenoms, EC 1, besteht zum größten Teil aus sich wiederholenden Einheiten von d (CT) oder d (CCTCT) (206).

Vermutlich kommt den mittelrepetitiven Sequenzen, vor allem B 1 und B 2, eine Rolle bei der Transkription zu. Von der L1Md-Sequenz sind zwar noch keine Transkripte bekannt, sie enthält aber mehrere offene Leseraster und eine Konsensus-Sequenz mit hn RNA (71). Der Aufbau der verschiedenen Familien ist, bis auf den der EC-1-Sequenz ähnlich, da sie alle ein Adeninreiches 3'-Ende besitzen. B1-, B2- und R-DNA kommt auf spc-DNA ("small polydisperse circular"-DNA), von kurzen Wiederholungssequenzen flankiert, vor. Sie besitzt Ähnlichkeiten zu Transposon-Familien aus Drosophila. Eine Funktion bei der Transposition wird deshalb diskutiert (199, 200).

Kleine nukleäre RNAs ohne Cap-Struktur besitzen Homologien zu verschiedenen Typen der Alu-Sequenz und der I.D.-Sequenz. Ihre Häufigkeit reicht von 10^4 - 10^6 Kopien pro Zelle (201).

Manche Ergebnisse sprechen für eine Rolle repetitiver Sequenzen bei der DNA-Replikation. Mittel- und hochrepetitive Sequenzen werden während der gesamten S-Phase über repliziert (47, 202). In der Maus lassen sich verschiedene Replikationsbanden unterscheiden: Die C-Bande repliziert oft spät in der S-Phase und enthält meist Satelliten-DNA. Die R- und G-Banden enthalten etwa gleich viele mittelrepetitive Sequenzen. Das L1Md-Element der Maus trägt eine Konsensus-Sequenz zum Papova-Virus-Replikationsursprung (202). Die von Russev, Vassilev und Anachkova (175, 179) isolierten Replikationsursprünge enthalten mittelrepetitive Sequenzen, und ebenso die in dieser Arbeit isolierten, am Beginn der S-Phase synthetisierten, DNA-Moleküle. Die Beteiligung der Kernmatrix, oder einer anderen übergeordneten Struktur, an der Organisation der DNA-Replikation ist in letzter Zeit wahrscheinlich gemacht worden (77). Mittelrepetitive Sequenzen der Maus sind am "scaffold", dem residualen Proteingerüst von Metaphasechromosomen, assoziiert (202).

Alle diese Aussagen können nur hindeuten auf eine Rolle dieser Sequenzen bei der DNA-Replikation und Transkription. Die Möglichkeit einer Kopplung von Transkription und Replikation ergibt sich durch die räumliche Nähe von Initiationsstellen für Transkription und Replikation (77) und durch Transposition über RNA-Intermediate (203, 184). Endgültige Beweise stehen aus und werden erst durch die Entwicklung von Methoden zur Identifizierung und Isolierung eukaryontischer Replikationsursprünge möglich sein.

Im Gegensatz zu den eukaryontischen Replikationsursprüngen sind die der Prokaryonten, Bakterien und Bakteriophagen, Eukaryontenviren, mitochondrialer DNA und von Plasmiden in ihrer Struktur und Funktion viel besser bekannt. Sie sind teilweise sequenziert und besitzen alle besondere DNA-Sequenzen, wie invers repetitive oder mehrmals wiederholte Sequenzen (2, 100). Durch die Isolierung der ars ("autonomously replicating sequences")-Sequenzen aus Hefe und dann aus

vielen anderen Organismen (Neurospora crassa, Dictyostelium discoideum, Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster, Zea mays, Chloroplasten und Mitochondrien) ist man der Aufklärung eukaryontischer Replikationsursprünge nähergekommen (s. Einleitung). Durch Vergleich der ars-Sequenzen wurde folgende Konsensus-Sequenz von 11 Basenpaaren gefunden:

5'-A/T TTT ATPu TTT A/T3'. Das Hefesystem, als das eines niederen Eukaryonten, ist aber nicht uneingeschränkt repräsentativ für höhere Eukaryonten. Sequenz-spezifische Replikationsursprünge sind je nach System verschieden. Man findet zum Beispiel keine im Xenopus-System (Xenopus-Eier) (180). Sequenzspezifische Replikationsursprünge höherer Eukaryonten versucht man über Sequenzhomologien zu finden. Die Alu-Sequenz der Primaten besitzt eine 14 Basenpaare lange Konsensus-Sequenz und die L1Md-Sequenz immerhin eine homologe Sequenz zum Papovavirus-Replikationsursprung (70, 71, 181). Die Matrix-DNA synchronisierter 3T3-Zellen ist angereichert an 11 Basenpaare langen Sequenzen, die zur Bindungsstelle des T-Antigens des BK-Virus homolog sind.

Da die eukaryontische DNA-Replikation bidirektional abläuft, könnte man auch erwarten, daß ihre Initiationsstellen zweifache Symmetrie, wie am Beispiel der Papova-Viren, aufweisen. Dies wurde auch von Bäzner (101) untersucht, der in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen am Anfang der S-Phase eine Anreicherung der "spezifischen Markierung" der Initiationsregion an invers repetitiven Sequenzen fand.

Die Übertragung von Virusmodellen auf Eukaryonten birgt jedoch Gefahren. Eukaryonten brauchen kein T-Antigen zur Replikation, ebenso kann auch SV 40 ohne funktionelles T-Antigen replizieren (183); und auch ohne einen Replikationsursprung, wenn er in Xenopus-Eier injiziert wird (57). Die Replikation ist dann aber streng gekoppelt, was darauf hindeutet, daß virale Replikationsursprünge eher der Abkopplung von der zellulären Replikationskontrolle dienen.

Der scheinbare Widerspruch sequenzspezifischer und unspezifischer Replikationsursprünge ließe sich durch die Abhängigkeit der Replikation von bestimmten Kernstrukturen, vor allem in sich schnell teilenden Organismen, erklären (180). Subnukleäre Strukturen, wie die auf verschiedene Weise isolierte Kernmatrix und andere Strukturen werden als Anheftungspunkte bei der Replikation diskutiert (14 - 16, 77, 185). Replikationsursprünge als Vermittler der Bindung von Chromatin an den Replikationskomplex ist vorgeschlagen worden (5). In Xenopus laevis injizierte DNA wurde sequenzunabhängig spontan von Kern-ähnlichen Strukturen umgeben (186). Alle Autoren sind sich über die Organisation der DNA in "loops" (Schleifen) oder Domänen von 30 - 100 kB, die an eine übergeordnete Kernstruktur gebunden sind, einig. Aber die Anordnung bestimmter Sequenzen auf den Schleifen, insbesondere auch die der Replikationsursprünge, ist umstritten. Eine ausführliche Diskussion findet sich bei Ebinger (14).

Es gibt viele Hinweise, daß die Kernmatrix nicht nur an der Replikation, sondern auch an der Transkription beteiligt ist. Für eine Kopplung der beiden Vorgänge spricht, daß aktive Gene differenzierter Zellen in der frühen S-Phase repliziert werden (47); und daß in Chromatinspreitungen aus Physarum polycephalum in der frühen S-Phase neusynthetisierte Transkripte mit Replikationsgabeln assoziiert sind (187).

Die Isolierung von Replikationsursprüngen aus dem Genom höherer Eukaryonten ist aufgrund dessen Komplexität und Größe äußerst schwierig. Als Untersuchungsmaterial boten sich deshalb die amplifizierten, kleinen, extrachromosomalen DNA-Elemente, mit den darauf codierten rRNA-Genen, aus Tetrahymena und Physarum an. Die rRNA des Seeigels Lytechinus variegatus kommt etwa 200 mal hintereinander im Genom vor. Sie kann aufgrund ihrer höheren Dichte als Satellit durch Gleichgewichtszentrifugation abgetrennt werden. Durch Restriktionsverdau mit Kpn I, das einmal pro Wiederholungseinheit schneidet, und elektronenmikroskopischer

Analyse replizierender Moleküle, ließ sich der Replikationsursprung im nicht-transkribierten Teil der Wiederholungseinheit lokalisieren. Ein Replikationsursprung im nicht-transkribierten Teil der rRNA-Gene von Drosophila wurde durch Miller-Spreitung wahrscheinlich gemacht (188). Dies stimmt auch mit den Verhältnissen bei Tetrahymena und Physarum überein. Dichteunterschiede nach BrdUrd-Markierung und die Scherempfindlichkeit wurden ausgenützt, um neusynthetisierte DNA am Anfang der S-Phase aus Physarum polycephalum zu isolieren (189).

Die Initiationsregion eines chromosomalen Replikons wurde auf der DNA eines Klons einer genomischen Bank kartiert. Durch eine das Dihydrofolatreduktase-Gen enthaltende, etwa 1000 mal amplifizierte Sequenz aus CHOC400-Zellen ließen sich Restriktionsfragmente isolieren, die früh in der S-Phase markierbar waren. Mit diesen wiederum konnten Klone, die diese Sequenz enthielten, identifiziert und kartiert werden (173).

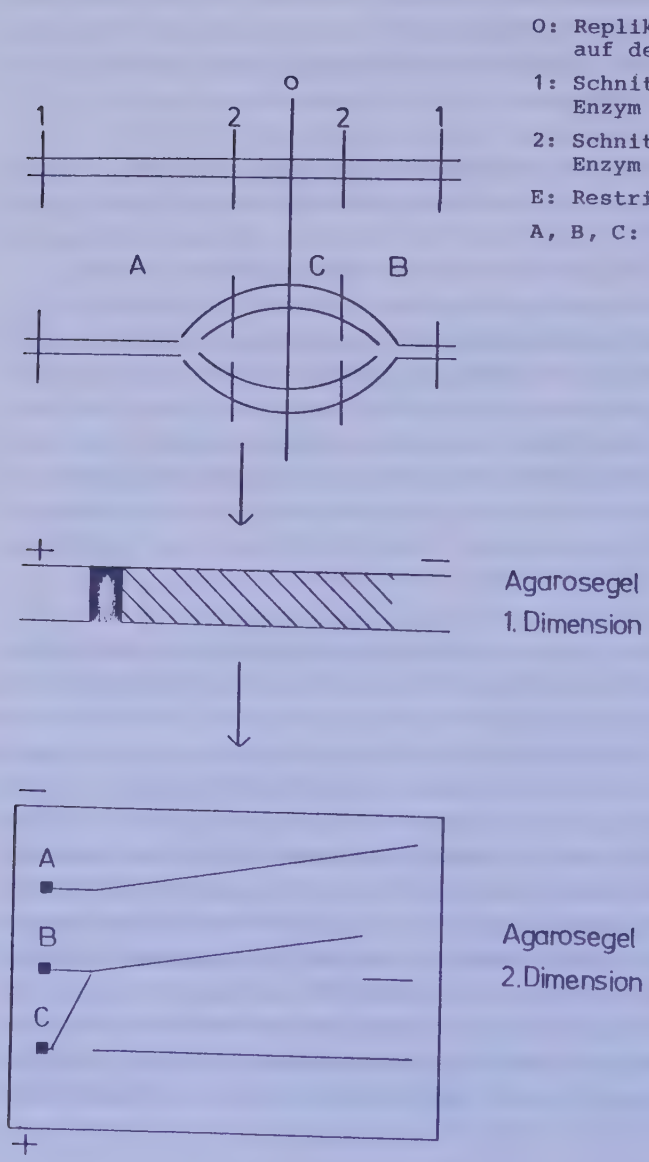
Nicht auf solche Spezialfälle beschränkt ist die Isolierung durch Ausschmelzen neusynthetisierter DNA. Diese Methode nützt die Gabelwanderung kurzer, neusynthetisierter DNA aus (170, 171). Am Modell des SV 40 konnte gezeigt werden, daß insbesondere nach Zerstörung der superhelikalen Struktur, neusynthetisierte DNA bevorzugt herausgeschmolzen wird. Eine etwa 1000-fache Reinigung den Replikationsursprung enthaltender Moleküle konnte erzielt werden. DNA-Moleküle aus dieser Präparation hybridisierten an SV 40-DNA symmetrisch um den Replikationsursprung. Die durch diese Methode isolierte, neusynthetisierte DNA synchronisierter CV-1-Zellen ließ sich außerdem durch Hg-dCTP-Markierung und Affinitätschromatographie 1620-fach anreichern. Die 500 - 2000 Basenpaare langen Fragmente wurden in pBR 322 kloniert. 80 % der Klone hybridisierte an früh in der S-Phase synthetisierte DNA (191).

Eine weniger elegante Methode ist die von Vassilev und Russev (175). Die DNA in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen wurde durch Trioxsalen quervernetzt. Zwischen den Quervernetzungsstellen war bidirektionale DNA-Synthese möglich. Die aus dieser DNA durch Denaturierung erhaltenen neusynthetisierten Moleküle sollten einen Replikationsursprung haben.

Eine Methode, die ohne Sonderfälle oder Eingriffe in die Vorgänge in der Zelle auskommt, wurde von Spotila und Huberman am SV 40-Modell beschrieben (176). Sie erlaubt die Lokalisierung von Replikationsursprüngen unabhängig davon, ob die DNA-Sequenz singulär oder repetitiv ist. Die Idee ist, daß Restriktionsfragmente mit zunehmender Größe einer eventuellen Replikationsgabel im Agarosegel retardiert werden. Durch die Richtung des Fortschreitens einer Replikationsgabel und die Abfolge ihres Erscheinens in Restriktionsfragmenten des ursprünglichen Restriktionsfragmentes, läßt sich der Replikationsursprung lokalisieren. Allerdings kommt auch diese Methode nicht ohne eine Anreicherung replikativer Strukturen aus (Abb. 33).

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode zur Anreicherung und Isolierung von Replikationsursprüngen soll ein weiterer Vorschlag in der Methodensammlung sein. Ihr Vorteil ist, daß sie nicht auf Spezialfälle wie extrachromosomale oder amplifizierte DNA angewiesen ist. Das Zellmaterial kann in größerer Menge gewonnen werden, wodurch genügend DNA für die weitere Charakterisierung isoliert werden kann. Eine Verbesserung der Anreicherung neusynthetisierter DNA wäre denkbar durch die von Zannis-Hadjopoulos et al. (190) benützte Methode der Affinitätschromatographie. Denn das Kriterium der Anreicherung wäre dann neusynthetisierte DNA selbst, und nicht das hier benützte Kriterium der einzelsträngigen DNA. Denn dadurch werden auch einzelsträngige DNA enthaltende Moleküle angereichert, die nicht im Zusammenhang mit der Replikation stehen.

Abb. 33: Schema zur Lokalisierung von Replikationsursprüngen nach Spotila und Huberman (176).



Als Perspektive für die weitere Charakterisierung bietet sich zunächst der Vergleich der mittelrepetitiven Sequenzen mit bereits bekannten des Mäusegenoms und mit denen anderer Spezies an. Weiterhin könnte nach der strukturellen Organisation in Bezug auf Matrix, Lamina oder Zugänglichkeit für Nukleasen im Chromatin gefragt werden.

Die im Elektronenmikroskop beobachtbaren kleinen Augen geben noch immer Anlaß zu Spekulationen. Durch ihre geringe Größe wird die Unsicherheit über Einzel- und Doppelstrangbereiche im Bereich der Augen groß. Außer durch den indirekten Nachweis ihres Einstranggehaltes mittels S1-Nuklease-Verdau (164), der durch die elektronenmikroskopische Auswertung auch sehr viel Mühe macht, ist Dunkelfeldelektronenmikroskopie geeignet. Diese Methode besitzt eine viel höhere Auflösung als die Mikroskopie im Hellfeld, da die Moleküle nicht mit Schwermetallen bedampft werden. Viele Strukturen werden dadurch besser erkannt, weil die Moleküle nicht zugeschüttet werden.

Tragen die in dieser Arbeit isolierten und teilweise charakterisierten DNA-Moleküle tatsächlich einen funktionellen Replikationsursprung, dann sollte es möglich sein, mit ihnen Vektoren zu konstruieren, die in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen effektiv und gekoppelt (?) replizieren.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, Replikationsursprünge von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, die ganz zu Beginn der S-Phase aktiviert werden, selektiv zu erfassen. Dazu sollten durch Zonalzentrifugation selektionierte G1-Zellen durch geeignete Maßnahmen veranlaßt werden, die Replikons der frühesten S-Phase nach Möglichkeit nur "anzureplizieren". Es wurde erwartet, daß in den aus der DNA solcher Zellen abtrennbaren replikativen DNA-Strukturen Replikationsursprünge angereichert sind.

Folgende Möglichkeiten zur Weiterbehandlung der G1-Zellen nach Selektion wurden auf ihre Eignung untersucht:

a) Vorübergehender Sauerstoffentzug
b) Desoxycytidinbehandlung nach 12-stündiger Hypoxie
c) Behandlung mit Methotrexat und Aphidicolin, jeweils einzeln oder in Kombination

Darüberhinaus wurde der Einfluß erniedrigter Temperaturen auf die relative Replikon-Initiationshäufigkeit sowie auf die Gabelgeschwindigkeit untersucht.

a) Vorübergehender Sauerstoffentzug

Die DNA-Synthese ließ sich durch Sauerstoffentzug auf ein niedriges Niveau reduzieren. Durch Wiederbelüften setzte die DNA-Synthese in unterschiedlichem Ausmaß wieder ein. Waren Zellen mit zunehmender Dauer der Hypoxie durch Wiederbelüften besser stimulierbar, dann erreichte oder übertraf die Syntheserate die der Kontrollkultur. War das nicht der Fall, dann schwankte die nach Wiederbelüften erreichte Syntheserate stark zwischen etwa 10 und 90 % der Kontrollkultur.

b) Desoxycytidinbehandlung nach zwölfstündiger Hypoxie

Es ergaben sich Hinweise, daß Desoxycyditin in Zellen, die hypoxisch gehalten werden, Initiationen stimulieren kann. Das Profil radioaktiv markierter DNA im alkalischen Sucrosegradienten verschiebt sich zu kleineren Kettenlängen.

c) Methotrexat, Aphidicolin

Methotrexat (10^{-6} M) und Aphidicolin (1 µg/ml) hemmen beide die DNA-Synthese sehr effektiv und reversibel. Aufgrund des Hemm-Mechanismus nimmt die Syntheserate unter Methotrexat allein mit der Zeit ab und bleibt unter Aphidicolin allein, sowie unter Methotrexat und Aphidicolin relativ konstant. Die Zellen treten unter den Blocks in die S-Phase ein. Sie bauen mit der Zeit zunehmend Nukleotide an kürzere Replikatinsintermediate an. Unter Aphidicolin ist ein langsames Wachstum der neusynthetisierten DNA zu erkennen.

Durch Kombination der beiden Hemmstoffe akkumuliert neugebildete DNA um 10^6 D (20 - 25 S). Die ab 8 Stunden nach Etablierung der genannten drei Hemmstoffblocks synthetisierte DNA wächst nach Blockaufhebung in höhermolekulare DNA. Zu Beginn des Methotrexatblockes werden DNA-Moleküle von 20 - 25 S und 60 - 80 S synthetisiert. Die Moleküle der 60 - 80 S-Fraktion wachsen nach Blockaufhebung vollständig zu gereifter DNA. Ein Teil der 20 - 25 S-Fraktion wächst innerhalb von 2,5 Stunden nicht. Ebenso reift ein Teil des zu Beginn eines Aphidicolinblocks synthetisierter DNA innerhalb von 4 Stunden nicht.

Faserautoratiographisch erfaßte Parameter ergaben, daß nach Wiederbelüften anaerober Zellkulturen Neuinitiationen nicht bevorzugt stattfinden.

Die Gabelgeschwindigkeit bei 20, 25 und 30° C ist erniedrigt.

Nach 5 Stunden Anaerobie mit Aphidicolin behandelte, asynchrone Zellen initiieren mit zunehmender Aphidicolinkonzentration mehr Replikons. Der Interinitiationsabstand und die Gabelgeschwindigkeit nehmen parallel dazu ab.

Aus den Ergebnissen der Voruntersuchungen wurde der Schluß gezogen, daß die Methotrexat beziehungsweise Methotrexat-Aphidicolin-Behandlung die besten Ergebnisse verspricht. Deshalb wurde aus G1-Zellen, die 10 Stunden mit Methotrexat und Methotrexat-Aphidicolin behandelt worden waren, DNA unter Beachtung der Instabilität replikativer Strukturen isoliert und im Elektronenmikroskop analysiert. Replikative Strukturen enthaltende DNA wurde hierzu durch Nitrozellulose-Chromatographie angereichert. Beobachtete Strukturen waren vor allem Gabeln und kleine Augen. Im besten Fall trugen etwa 5 % aller Moleküle Augen. Quervernetzung der DNA mit Trioxsalen in vivo erbrachte eine Verbesserung der Ausbeute an replikativen Strukturen. Die kleinen Augen fielen zum überwiegenden Teil in den Größenbereich von 400 - 500 Basen. Sie korrelierten mit der Größe neusynthetisierter DNA im alkalischen Sucrosegradienten. Bis zu 80 % dieser Moleküle enthielten repetitive Sequenzen, wie durch Analyse der Reassoziationskinetik festgestellt wurde.

6. Literaturverzeichnis

1. Hand, R., (1978), Cell 15, 317 - 325

2. Challberg, M. D., (1982), Ann. Rev. Biochem. 51, 901 - 934

3. Taylor, J. H., (1978) in: DNA-Synthesis: Present and Future, Plenum Press, 143 - 159

4. Harland, R., (1981) TIBS 6, 71 - 74

5. Laskey, R. A., (1981) Cell 24, 283 - 284

6. Kornberg, A., (1984) TIBS 9, 122 - 124

7. Nossal, N. G., (1983) Ann. Rev. Biochem. 53, 581 - 615

8. Feinberg, A. P., Coffey D. S., (1982) in: The Nuclear Envelope and the Nuclear Matrix (Maul, G. G. ed.) Alan R. Liss, New York, 293 - 305

9. Kornberg, A., (1980) DNA-Replication, Freeman and Company, San Francisco

10. Blumenthal, A. B., Kriegstein, J. H., Hogness, D. S., (1974) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 205 - 223

11. Kapp, L. N., Painter, R. B. (1982) International Review of Cytology 80, 1 - 25

12. Cairns, J., (1963) J. Mol. Biol. 6, 208 - 213

13. Dingman, C. W., (1974) J. Theor. Biol 43, 187 - 197

14. Ebinger, T., (1985) Dissertation, Universität Tübingen

15. Stropp, U., (1985) Dissertation, Universität Tübingen

16. Herzog, R., (1984) Dissertation, Universität Tübingen

17. Berezney, R., Coffey, D. S., (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 1410 - 1417

18. DePamphilis, M. L., Wassarman, P. M., (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 627 - 666

19. Haußer, H.-J., (1984) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

20. Reddy, G. P. V., Pardee, A. B., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3312 - 3316

21. Grosse, F., Krauss, G., (1985) J. Biol. Chem. 260, 1881 - 1885

22. Funderud, S., Andreassen, R., Haugli, F., (1978), Cell 15, 1519 - 1526

23. Kowalski, J., Cheevers, W. P., (1976) J. Mol. Biol. 104, 603 - 615

24. Fraterman, A., (1978) Dissertation, Universität Tübingen

25. Helftenbein, E., (1982) Dissertation, Universität Tübingen

26. Wais, R., Fraterman, A., Stumpf, Ch., Probst, H., (1979) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 715 - 743

27. Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J. L., Ketzien, R. F., (1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 715 - 743

28. Das, M., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 5677 - 5681

29. Weinmann-Dorsch, Ch., Hedl, A., Grummt, I., Albert, W., Ferdinand, F.-J., Friis, R. R., Pierron, G., Moll, W., Grummt, F., (1984) Eur. J. Biochem. 138, 179 - 185

30. Grummt, F., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 371 - 375

31. Sun. I. L., Crane, F. L., Grebing, C., Löw, H., (1985) Exp. Cell Res. 156, 528 - 536

32. Heldin, C. H., Westermark, B., (1984) Cell 37, 9 - 20

33. Olivotto, M., Paoletti, F., (1981) J. Cell Physiol. 107, 243 - 249

34. Löffler, M., (1980) Eur. J. Biochem. 107, 207 - 215

35. Löffler, M., Schimpf-Weiland, G., Follmann, H., (1983) FEBS Lett. 156, 72 - 76

36. Löffler, M.,, Postius, S., Schneider, F., (1980) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1313

37. Löffler, M., (1985) Exp. Cell Res. 157, 195 - 206

38. Krause, H. P., Probst, H., Schneider, F., (1971) Z. Naturforschung 26 b, 780 - 787

39. Krause, H. P., Schneider, F., (1974), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1335 - 1340

40. Merz, R., Schneider, F., (1982) Z. Naturforschung 37 c, 326 - 334

41. Probst, H., Gekeler, V., (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 94, 55 - 60

42. Marx, J. L., (1985) Science 228, 312 - 313

43. Chafouleas, J. G., Bolton, W. E., Hidaka, H., Boyd, A. E., Means, A. R., (1982) Cell 28, 41 - 50

44. Donnelly, T. E., Sittler, R., Scholar, E. M., (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 126, 741 - 747

45. Probst, H., Gekeler, V., Helftenbein, E., (1984) Exp. Cell Res. 154, 327 - 341

46. Holmquist, G., Gray, T., Porter, T., Jordan, J., (1982) Cell 31, 121 - 129

47. Goldmann, M. A., (1984) Science 224, 686 - 692

48. Bouchard, R. A., (1982) International Review of Cytology 76, 113 - 191

49. Georgiev, G. P., Ilyin, Y. V., Chmelianskaite, V. G., Ryskov, A. P., Kramerov, P. A., Skryabin, K. G., Krayev, A. S., Lukaridin, E. M., Grigoryan, M. S., (1980) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45, 641 - 653

50. Arai, K., Kornberg, A., (1981) in: Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology 26, Herausgeber: Cohn, W., Academic Press, New York, 33 - 48

51. Moriya, S., Ogasawa, N., Yoshikawa, H., (1985) Nucleic Acid Res. 13, 2251 - 2266

52. Stinchomb, D. T., Mann, K., Selker, E., Davis, R. W., (1981) ICN-UCLA Symp. Mol. Cell Biol. 22, 473 - 488

53. Baldacci, G., Chérif-Zahar, B., Bernardi, G., (1984) EMBO J. 3, 2115 - 2120

54. Filutowicz, M., Helsinki, D. R., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1480 - 1484

55. Rawlins, D. R., Rosenfeld, P. J., Wides, R. J., Challberg, M. D., Kelly, T. J. jr., (1984) Cell 37, 309 - 319

56. Wilson, D. A., Thomas, C. A., (1974) J. Mol. Biol. 84, 115 - 144

57. Harland, R. M., Laskey, R. A., (1980) Cell 21, 761 - 771

58. McTiernan, C. F., Stambrook, P. J., (1980) J. Cell Biol. 87, 45 a

59. Chambers, J. C., Watanabe, S., Taylor, J. H., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5572 - 5576

60. Hines, P. J., Benbow, R. M. (1982) Cell 30, 459 - 468

61. Watanabe, S., Taylor, J. H., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5292 - 5296

62. Stinchomb, D. T., Struhl, K., Davis, R. W., (1979) Nature 282, 39 - 43

63. Stinchomb, D. T., Thomas, M., Kelly, J., Selker, E., Davis, R. W., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4559 - 4563

64. Chan. C. S. M., Tye, B.-K., (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6329 - 6333

65. Rochaix, J.-D., van Dillewijn, J., Rahire, M., (1984) Cell 36, 925 - 931

66. Botchan, P. M., Dayton, A. J., (1982) Nature 299, 453 - 456

67. Robbersen, P. L., Clayton, D. A., Morrow, J. F., (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4447 - 4451

68. Cech, T., Brehm, S. L., (1981) Nucleic Acid. Res. 9, 3531 - 3543

69. Truett, M. A., Gall, J. G., (1977) Chromosoma 64, 295 - 303

70. Jelinek, W. R., Toomey, T. P., Leinwand, L., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1398 - 1404

71. Singer, M. F., Skowronski, J., (1985) TIBS 10, 119 - 122

72. Kramerov, D. A., Grigoryan, A. A., Ryskov, A. P., Georgiev, G. P., (1979) Nucleic Acid Res. 6, 697 - 713

73. Krayev, A. S., Kramerov, D. A., Skryabin, K. G., Ryskov, A. P., Bayev, A. A., Georgiev, G. P., (1980) Nucleic Acid Res. 8, 1201 - 1215

74. Foster, K. A., Collins, J. M., (1985) J. Biol. Chem. 260, 4229 - 4235

75. Valenzuela, M. S., Mueller, G. C., Dasgupta, S., (1983) Nucleic Acids Res. 11, 2155 - 2164

76. Ebinger, T., (1982) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

77. Zehnbauer, B. A., Vogelstein, B., (1985) BioEssays 2, 52 - 54

78. Probst, H., Maisenbacher, J., (1975) in: Methods in Cell Biology 12, 173 - 184, Herausgeber: D. Prescott, New York

79. Probst, H., Maisenbacher, J., (1973) Exp. Cell Res. 78, 335 - 344

80. Gekeler, V., (1982) Dissertation, Universität Tübingen

81. Gekeler, V., (1978) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

82. Probst, H., Maisenbacher, J., (1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 625 - 633

83. Fridland, A., Brent, T. P., (1975) Eur. J. Biochem. 57, 379 - 385

84. Hubermann, J. A., (1981); Cell 23, 647 - 648

85. Spadari, S., Sala, F., Pedrali-Noy, G., (1982) TIBS 7, 29 - 32

86. Oguro, M., Suzuki-Hori, Ch., Nagano, H., Mano, Y., Ikegami, S., (1979) Eur. J. Biochem. 97, 603 - 607

87. Geuskens, M., Hardt, N., Pedrali-Noy, G., Spadari, S., (1981) Nucleic Acid Res. 9, 1599 - 1618

88. Lönn, U., Lönn, S., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3996 - 3999

89. Kozu, T., Tatsuo, Y., Seno, T., (1983) Exp. Cell Res. 149, 189 - 200

90. Maisenbacher, J., (1973) Dissertation, Universität Tübingen

91. Kienzle, H., (1982) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

92. Müller-Scholz, D., (1977) Dissertation, Universität Tübingen

93. Marusyk, R., Sergeant, A., (1980) Analytical Biochemistry 105, 403 - 404

94. Stropp, U., (1982) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

95. Labarca, C., Paigen, K., (1980) Analytical Biochemistry 102, 344 - 352

96. Studier, F. W., (1965) J. Mol. Biol. 11, 373 - 390

97. Hand, R., Tamm, J., (1974) J. Mol. Biol. 82, 175 - 183

98. Blütters, R., (1978) Dissertation, Universität Tübingen

99. Blütters, R., (1974) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

100. Bäzner, S., (1978) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

101. Bäzner, S., (1982) Dissertation, Universität Tübingen

102. Lang, D., Mitani, M., (1970) Biopolymers 9, 373 - 379

103. Broude, N. E., Budowsky, E. J., (1971) Biochim. Biophys. Acta 254, 380 - 388

104. Cole, R. S., (1971) Biochim. Biophys. Acta 254, 34 - 39

105. Hearst, J. E., Isaacs, S. T., Kanne, D., Rapoport, H., Straub, K., (1984) Quarterly Review of Biophysics 17, 1 - 44

106. Decout, J.-L., Huart, G., Lhomme, J., (1984) Nouveau Journale de Chimie 8, 433 - 435

107. Sogo, J. M., Ness, P. J., Widmer, R. M., Parish, R. W., Koller, T., (1984) J. Mol. Biol. 178, 897 - 928

108. Cech, T. R., Potter, D., Pardue, M. L., (1978) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 191 - 198

109. Hanson, C. V., Shen, Ch.-K. J., Hearst, J. E., (1976) Science 193, 62 - 64

110. Cech, T. R., Pardue, M. L., (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2644 - 2648

111. Peckler, S., Graves, B., Kanne, D., Rapoport, H. Hearst, J. E., Kim, S.-H., (1982), J. Mol. Biol. 162, 157 - 172

112. Potter, D. A., Fostel, J. M., Berninger, M., Pardue, M. L., Cech, T. R., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4118 - 4122

113. Cech, T. R., Potter, D. A., Pardue, M. L., (1977) Biochemistry 16, 5313 - 5321

114. Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory

115. Britten, R. J., Graham, D. E., Neufeld, B. R., (1974) Methods in Enzymology 29 E, Herausgeber: Grossmann, L., Moldave, K., Academic Press, New York, 363 - 408

116. Hood, L. E., Wilson, J. H., Wood, W. B., (1978) Molecular Biology of Eucaryontic Cells I, Herausgeber: Benjamin, W. A., Inc.

117. Bernardi, G., (1969) Biochem. Biophys. Acta 174, 423 - 434

118. Karzel, K., (1965). Med. Pharmakol. Exp. 12, 137 - 142

119. Schindler, R., (1959) Cancer Res. 19, 47 - 53

120. Wurster, U., (1970) Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

121. Probst, H., Ullrich, A., Krauss, G., (1971) Biochem. Biophys. Acta 254, 15 - 29

122. Probst, H., Jenke, S., (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm. 52, 800 - 806

123. Nicander, B., Reichard, P., (1985) J. Biol. Chem. 260, 5376 - 5381

124. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson J. D., (1983) Molecular Biology of the Cell, Herausgeber: Garland Publishing Inc., New York

125. Warburg, O., Geissler, A. W., Lorenz, S., (1962) Z. Naturforschung 17 b, 758 - 761

126. Spiro, I. J., Rice, G. C., Durand, R. E., Stickler, R., Ling, C. L., (1984) Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 10, 1275 - 1280

127. Merz, R., Schneider, F., (1982) Z. Naturforschung 37 c, 326 - 334

128. Webster, P. L., Van't Hof, J., (1969) Exp. Cell Res. 55, 88 - 94

129. Born, R., Dahr, P., Dormer, P., Trott, K. R., (1973) Experientia 29, 464 - 465

130. Löffler, M., Postius, S., Schneider, F., (1978) Virchow's Arch. B Cell Path. 26, 356 - 368

131. Merz, R., Schneider, F., (1983) Z. Naturforschung 38 c, 313 - 318

132. Gautschi, J. R., Kern, R. M., Painter, R. B., (1973) J. Mol. Biol. 80, 393 - 403

133. Eriksson, S., Skog, S., Tribukait, B., Jäderberg, K., (1984) Exp. Cell Res. 155, 129 - 140

134. Maybaum, J., Cohen, M. B., Sadee, W. J., (1981) J. Biol. Chem. 256, 2126 - 2130

135. Snyder, R. D., Regan, D., (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 99, 1088 - 1094

136. Giulotto, E., Mondello, Ch., (1981) Biochem. Biophys. Res. Comm. 99, 1287 - 1294

137. Bermudez, E., (1982) Biochem. Biophys. Res. Comm. 109, 275 - 281

138. Pedrali-Noy, G., Mazza, G., Focher, F., Spadari, S., (1980) Biochem. Biophys. Res. Comm. 93, 1094 - 1103

139. Nocentini, S., (1982) Biochem. Biophys. Res. Comm. 109, 603 - 611

140. Yagura, T., Kozu, T., Seno, T., (1982) Eur. J. Biochem. 123, 15 - 21

141. Pedrali-Noy, G., Spadari, S., Miller-Faurès, A., Müller, A. O. A., Kruppa, J., Koch, G., (1980) Nucleic Acid Res. 8, 377 - 387

142. Rainaldi, G., Sessa, M. R., Mariani, T., (1984) Chromosoma 90, 46 - 49

143. Kwant, M. M., Van der Vliet, P. C., (1980) Nucleic Acid Res. 8, 3986 - 3993

144. Pedrali-Noy, G., Spadari, S., (1979) Biochem. Biophys. Res. Comm. 88, 1194 - 1202

145. Li, J. C., Kaminskas, E., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5694 - 5698

146. Sedwick, D. W., Kutler, M., Brown, O. E., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 917 - 921

147. Weaver, D. T., DePamphilis, M. L., (1984) J. Mol. Biol. 180, 961 - 986

148. Schvartzman, J. B., Krimer, D. B., (1985) Biochim. Biophys. Acta 824, 194 - 200

149. Huberman, J. A., Riggs, A. D., (1968) J. Mol. Biol. 32, 327 - 341

150. Kit, S., (1961), J. Mol. Biol. 3, 711 - 716

151. Ockey, C. H., (1982) Eur. J. Cell Biol. 27, 25 - 33

152. Cohen, J. E., Jasny, B. R., Tamm, J., (1979), J. Mol. Biol. 128, 219 - 245

153. Taylor, J. H., (1977) Chromosoma 62, 291 - 300

154. Murakami, Y., Yasuda, H., Miyazawa, H., Hanaoka, F., Yamada, M.-A., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1761 - 1765

155. Dickinson, J. R., (1984) TIBS 9, 269 - 271

156. Berridge, M. J., Irvine, R. F., (1984) Nature 312, 315 - 320

157. Stötzer, K. E., (1985) Dissertation, Universität Tübingen

158. Heintz, N. H., Hamlin, J. L., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4083 - 4087

159. Radford, I. R., Martin, R. F., Finch, L. R., Hodgson, S., (1982) Biochim. Biophys. Acta 696, 154 - 162

160. Glover, T. W., Berger, C., Coyle, J., Echo, B., (1984) Human Genetics 67, 136 - 142

161. Newlon, C. S., Petes, T. D., Hereford, L. M., Fangman, W. L., (1974) Nature 247, 32 - 35

162. Kriegstein, H. J., Hogness, D. S., (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 135 - 139

163. Zakian, V. A., (1976) J. Mol. Biol. 108, 305 - 331

164. Baldari, C. T., Amaldi, F., (1978) Cell 15, 1095 - 1107

165. Funderud, S., Andreassen, R., Haugli, F., (1979) Nucleic Acid Res. 6, 1417 - 1431

166. Ravel-Chapuis, R., Heizmann, P., Nigon, V., (1982) Nature 300, 78 - 81

167. Kitchin, P. A., Klein, V. A., Feni, B. F., Englund, P. T., (1984) J. Biol. Chem. 259, 15532 - 15539

168. Bozzoni, I., Baldari, C. T., Amaldi, F., Buongiorno-Nardelli, M., (1981) Eur. J. Biochem. 118, 585 - 590

169. Hardman, N., Gillespie, D. A. F., (1980) Eur. J. Biochem. 106, 161 - 167

170. Aelen, J. M. A., Wanka, F., (1984) Exp. Cell. Res. 154, 394 - 401

171. Tatsumi, K., Strauss, B., (1978) Nucleic Acid Res. 5, 331 - 347

172. Hines, P. J., Benbow, R. M., (1982) Cell 30, 459 - 468

173. Heintz, N. H., Milbrandt, J. D., Greisen, K. S., Hemlin, J. L., (1983) Nature 302, 439 - 441

174. Sinden, R. R., Hagerman, P. J., (1984) Biochemistry 23, 6299 - 6303

175. Russev, G., Vassilev, L., (1982) J. Mol. Biol. 161, 77 - 87

176. Spotila, L. D., Huberman, J. A., (1985) Molecular and Cellular Biology 1, 85 - 92

177. Klotz, G., Kleinschmidt, A. K., Goebel, W., (1978) Proceedings of the Ninth Internat. Congress on EM, Toronto, Ed. J. M. Sturgess, 196

178. Laughlin, T. J., Taylor, J. H., (1979) Chromosoma 75, 19 - 35

179. Anachkova, B., Todorova, M., Vassilev, L., Russev, G., (1984) FEBS Lett. 141, 105 - 108

180. Méchali, M., Kearsey, S., (1984) Cell 38, 55 - 64

181. Fanning, T. G., (1983) Nucleic Acid Res. 11, 5073 - 5091

182. Goldberg, G. I., Collier, I., Cassel, A., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6887 - 6891

183. Martin, R. G., Setlow, V. P., (1980) Cell 20, 381 - 391

184. Sharp, P. A., (1983) Nature 301, 471 - 472

185. Todorova, M., Russev, G., (1984) Biochim. Biophys. Acta 783, 36 - 41

186. Forbes, D. J., Kirschner, M. W., Newport, Y. W., (1983) Cell 34, 13 - 23

187. Pierron, G., Sauer, H. W., (1982) Eur. J. Cell Biol. 29, 104 - 113

188. McKnight, S. L., Bustin, M., Miller, O. L., (1977) Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol. 42, 741 - 754

189. Beach, D., Piper, M., Shall, S., (1980) Exp. Cell Res. 129, 211 - 221

190. Zannis-Hadjoupoulos, M., Persico, M., Martin, R. G., (1981) Cell 27, 155 - 163

191. Kaufmann, G., Zannis-Hadjoupoulos, M., Martin, R. G., (1985) Mol. Cell. Biol. 4, 721 - 727

192. Shimizu, Y., Yoshida, K., Ren, Ch.-Sh., Fujinaga, K., (1983) Nature 302, 587 - 590

193. Sugino, A., Nakayama, K., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7049 - 7053

194. Weaver, D. T., DePamphilis, M. L., (1982) J. Biol. Chem. 257, 2075 - 2086

195. Zannis-Hadjoupoulos, M., Kaufmann, G., Martin, R. G., (1984) J. Mol. Biol. 179, 577 - 586

196. Bennett, K. L., Hill, R. E., Pietras, D. F., Woodworth-Gutai, M., Kane-Haas, C., Houston, J. M., Heath, J. K., Hastie, N. D., (1984) Molecular and Cellular Biology 4, 1561 - 1571

197. Kramerov, D. A., (1985) Biochim, Biophys. Acta 824, 85 - 98

198. Ryskov, A. P., Ivanov, P. L., Tokarskaya, O. N., Kramerov, D. A., Grigoryan, M. S., Georgiev, G. P., (1985) FEBS Lett. 182, 73 - 80

199. Fujimoto, S., Tsuda, T., Toda, M., Yamagishi, H., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2072 - 2076

200. Jones, R. S., Potter, S. S., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1989 - 1993

201. Saba, J. A., Busch, H., Reddy, R., (1985) J. Biol. Chem. 260, 1354 - 1357

202. Vizard, D. L., Rosenberg, N. L., (1984) Biochim. Biophys. Acta 782, 402 - 407

203. Baltimore, D., (1985) Cell 40, 481 - 482

Lebenslauf

Name:	Hildegard Kienzle-Pfeilsticker
Geburtstag und Geburtsort:	3.5.1956, Herrenberg
Eltern:	Erna und Otto Kienzle
Familienstand:	verheiratet

Schulbildung:	1963 - 1966	Grundschule in Herrenberg
	1966 - 1975	Schickhardt-Gymnasium in Herrenberg
	1975	Abitur

Studium: Wintersemester 1975/76 Chemie/Diplom an der Universität Tübingen

Sommersemester 1976 Biochemie/Diplom an der Universität Tübingen

Wintersemester 1979/80 bis Sommersemester 1980 Chemie/Diplom an der Universität München. Praktikum am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried und am Institut für Physiologische Chemie der Universität München

Wintersemester 1981 Biochemie/Diplom an der Universität Tübingen

Sommersemester 1982 Chemie/Biologie Staatsexamen an der Universität Tübingen

Auslandsaufenthalt: 1. Juli bis 30. September 1983 bei Professor Dr. D. T. Denhardt am Cancer Research Laboratory der University of London

Prüfungen:	März 1977 Diplomvorprüfung 1. Teil März 1978 Diplomvorprüfung 2. Teil Juni 1981 Diplomhauptprüfung
Diplomarbeit:	September 1981 bis Juli 1982 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen
Dissertation:	Von August 1982 bis Oktober 1985 unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Probst am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen. Thema: "Selektive Erfassung von Replikationsursprüngen in der DNA von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen."

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Biochemie und Molekularbiologie:
Probst, Mecke, Guglielmi, Eisele, Weitzel, Weber, Wendel, Weser, Bisswanger, Kröger, Feldmann, Zillig.

Organische Chemie:
Bayer, Hagenmaier, Voelter

Anorganische Chemie:
Strähle, Lindner

Physikalische Chemie:
Mauser, Braun

Pharmakologie:
Remmer, Pfaff, Breyer-Pfaff

Physiologie:
Betz, Jacob

Anatomie:
Reutter

Mikrobiologie:
Zähner, Braun

Zoologie:
Grell, Rähle, Bunke

Botanik:
Mayer, Metzner, Agerer, Oberwinkler

Genetik:
Seyffert

Mathematik:
Pommer

Physik:
Gönnenwein, Brendle

Strahlenschutz:
Feine, Kallee